

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

PCT/EP 03 / 09594

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 15 SEP 2003  
WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**BEST AVAILABLE COPY**

**Aktenzeichen:** 102 41 124.7

**Anmeldetag:** 3. September 2002

**Anmelder/Inhaber:** SunGene GmbH & Co KGaA, Gatersleben/DE

**Bezeichnung:** Transgene Expressionskassetten zur Expression  
von Nukleinsäuren in nicht-reproduktiven Blüten-  
geweben von Pflanzen

**IPC:** C 12 N, C 07 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 30. Juli 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

im Auftrag

Sieg

Transgene Expressionskassetten zur Expression von Nukleinsäuren  
in nicht-reproduktiven Blütengeweben von Pflanzen

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in nicht-reproduktiven Blütengeweben von Pflanzen, sowie transgene Expressionskassetten und  
10 Expressionsvektoren, die Promotoren mit einer Expressionsspezifität für nicht-reproduktive Gewebe der Blüte enthalten. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen transgenen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren transformierte Organismen (bevorzugt Pflanzen), davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut,  
15 sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel  
20 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika (Dunwell JM (2000) J Exp Bot 51 Spec No:487-96). Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene ist die Bereitstellung pflanzenspezifischer Promotoren. Promotoren sind wichtige Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie, um die Expression bestimmter Gene in einer transgenen Pflanze zu steuern und so bestimmte Wesensmerkmale der Pflanze zu erzielen.

30 Verschiedene pflanzliche Promotoren sind bekannt, zum Beispiel konstitutive Promotoren wie der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobakterium, der TR-Doppelpromotor oder der Promotor des 35S-Transkriptes des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) (Odell et al. (1985) Nature 313:810-812). Nachteilig bei diesen Promotoren ist, dass  
35 sie in fast allen Geweben der Pflanze konstitutiv aktiv sind. Eine gezielte Expression von Genen in bestimmten Pflanzenteilen oder zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten ist mit diesen Promotoren nicht möglich.

40 Beschrieben sind Promotoren mit Spezifitäten für verschiedene pflanzliche Gewebe wie Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln, Knollen oder Samen. Die Stringenz der Spezifität, als auch die Expressionsaktivität dieser Promotoren ist sehr unterschiedlich.

Die pflanzliche Blüte dient der geschlechtlichen Fortpflanzung der Samenpflanzen. Pflanzliche Blüten - vor allem die Blütenblätter (Petalen) - akkumulieren häufig große Mengen sekundärer Pflanzenstoffe, wie beispielsweise Terpene, Anthocyane, Carotinoide, Alkaloide und Phenylpropanoide, die der Blüte als Duftstoffe, Abwehrstoffe oder als Farbstoffe dienen. Viele dieser Substanzen sind von ökonomischem Interesse. Zudem ist die Blütenknospe und die Blüte der Pflanze ein empfindliches Organ, besonders gegen Stressfaktoren wie Kälte.

10

Der *Arabidopsis thaliana* Gen-Locus At2g46720 (GenBank Acc.-No.: NC\_003071.1; *Arabidopsis thaliana* chromosome 2; Basenpaare 19147356 bis 19148756) kodiert für eine putative  $\beta$ -Ketoacyl-CoA-synthase (abgeleitete cDNA: GenBank Acc.-No: NM\_130237.1; SEQ ID NO: 16). Der *Arabidopsis thaliana* Gen-Locus At3g01980 (GenBank Acc.-No.: NC\_003074; *Arabidopsis thaliana* chromosome 3; Basenpaare: komplement 327677 bis 329029) kodiert für eine putative Dehydrogenase (abgeleitete cDNA: GenBank Acc.-No: NM\_111064; SEQ ID NO: 18). Der *Arabidopsis thaliana* Gen Locus At1g63140 (GenBank Acc.-No: NC\_003070.2; *Arabidopsis thaliana* chromosome 1; Basenpaare 23069430 bis 23070871) kodiert für eine putative Koffein-säure-O-methyltransferase (abgeleitete cDNA: NM\_104992.1; SEQ ID NO: 20). Die exakte Funktion, Transkription und die Expressionsmuster dieser Gene ist nicht beschrieben.

25

Blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen-synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder der Promoter des APETALA3 Gens (Hill TA et al. (1998) Development 125:1711-1721) sind bekannt. Diese Promotoren weisen jedoch alle einen oder mehrere Nachteile auf, die eine breite Nutzung beeinträchtigen:

- 1) Sie sind innerhalb der Blüte spezifisch für ein oder mehrere Blütengewebe und gewährleisten nicht die Expression in allen Geweben der Blüte.
- 2) Sie sind - wie im Beispiel des an der Blütenentwicklung beteiligten APETALA3 Gens - während der Blütenentwicklung stark reguliert und nicht zu allen Phasen der Blütenentwicklung aktiv.
- 3) Sie zeigen mitunter starke Nebenaktivitäten in anderen pflanzlichen Geweben. So zeigen die bekannten Promotoren (wie z.B. der APETALA3 Promotor) meist eine Aktivität in Samen, Antheren und den Ovarien der Blüte. Diese stellen empfindliche, direkt an der Fortpflanzung der Pflanzen beteiligte Blütenorganen dar. Eine Expression hier ist in vielen Fällen unnötig und unvorteilhaft, da sie mit der Reproduktion der Pflanze interferieren

kann. Zudem kann das exprimierte Genprodukt durch Samen- und Pollenflug unerwünscht verbreitet werden. Dies ist im Sinne einer biotechnologischen Nutzung transgener Pflanzen weitgehend zu vermeiden.

5

Trotz der Vielzahl bekannter pflanzlicher Promotoren wurde bislang kein Promotor mit einer Spezifität für die pflanzliche Blüte identifiziert, der keine wesentliche Expression in den Pollen und Ovarien besitzt, also nur in den nicht-reproduktiven Geweben aktiv ist. Auch sind keine Promotoren bekannt, die neben der oben genannten Spezifität im wesentlichen während der gesamten Blütenentwicklung aktiv sind.

Es bestand daher die Aufgabe, Verfahren und geeignete Promotoren für die gezielte, transgene Expression von Nukleinsäuren in den nicht-reproduktiven Blütengeweben bereitzustellen. Diese Aufgabe wurde durch Bereitstellung der Promotoren der Gene mit den Genlokalusbezeichnungen At2g46720 (infolge "60L"-Promotor; SEQ ID NO: 1), At3g01980 (infolge "76L"-Promotor; SEQ ID NO: 2) und 20 At1g63140 (infolge "84L"-Promotor; SEQ ID NO: 3) aus *Arabidopsis thaliana* gelöst. Diese Promotoren zeigen eine Expression in allen Blütenorganen außer den Pollen und den Ovarien. Dieses Expressionsmuster kann in der Blütenknospe, der Blüte und der welkenden Blüte beobachtet werden.

25

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in nicht-reproduktiven Blütengeweben von Pflanzen, wobei nachfolgende Schritte umfasst sind:

30

I. Einbringen einer transgenen Expressionskassette in pflanzliche Zellen, wobei die transgene Expressionskassette mindestens nachfolgende Elemente enthält

35

a) mindestens eine Promotorsequenz ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus

i) den Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 und

40

ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 und

45

iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3,

5

und

- b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und  
10 c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz heterolog ist, und  
15

- II. Auswahl von transgenen Zellen, die besagte Expressionskassette stabil in das Genom integriert enthalten, und  
20 III. Regeneration von vollständigen Pflanzen aus besagten transgenen Zellen, wobei mindestens eine der weiteren Nukleinsäuresequenz in im wesentlichen allen nicht-reproduktiven Blütengeweben, jedoch im wesentlichen nicht im Pollen und den Ovarien exprimiert wird.

25

Ein weiterer Gegenstand betrifft transgene Expressionskassetten, wie sie z.B. in dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Einsatz kommen können. Bevorzugt umfassen die transgenen Expressionskassetten zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in nicht-reproduktiven Blütengeweben von Pflanzen,  
30

- a) mindestens eine Promotorsequenz ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus  
35 i) den Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 und 3 und  
ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 und 3 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3  
40  
iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) und ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3  
45

und

- b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,
- 5 wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz heterolog ist.
- 10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können weitere genetische Kontrollsequenzen und/oder zusätzliche Funktionselemente enthalten.
- 15 Bevorzugt können die transgenen Expressionskassetten durch die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, und/oder die Expression einer von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten sense-RNA, anti-sense-RNA oder doppelsträngigen RNA ermöglichen.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, die eine der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Expressionsvektoren enthalten. Der Organismus kann ausgewählt sein aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, nicht-menschlichen tierischen und pflanzlichen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder
- 25 Vermehrungsgut, bevorzugt ist der Organismus ausgewählt aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.
- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der besagten Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermittel, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, wobei die Feinchemikalien bevorzugt Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe
- 30 sind. Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Herstellung besagter Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien unter Einsatz der erfindungsgemäßen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut.
- 35

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten sind aus nachfolgenden Gründen besonders vorteilhaft:

- a) Sie gewähren eine selektive Expression in den nicht-reproduktiven Geweben der Blütenknospe und der Blüte der Pflanze und ermöglichen zahlreiche Anwendungen, wie beispielsweise eine Resistenz gegen Stressfaktoren wie Kälte oder eine gezielte Synthese von sekundären Pflanzenstoffen. Die Expression ist im wesentlichen konstant über den gesamten Entwicklungszeitraum der Blütenknospe und Blüte.
- b) Sie zeigen keine Expression in reproduktiven Geweben (z.B. Pollen oder Ovarien), wodurch Störungen der Fortpflanzung und eine Verbreitung des transgenen Proteins durch Pollen- oder Samenflug vermieden wird.

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten, die von ihnen abgeleiteten transgenen Expressionsvektoren und transgenen Organismen können funktionelle Äquivalente zu den unter SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotorsequenzen umfassen.

Die Promotoraktivität eines funktionell äquivalenten Promotors wird als "im wesentlichen gleich" bezeichnet, wenn die Transkription einer bestimmten transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle des besagten funktionell äquivalenten Promotors unter ansonsten unveränderten Bedingungen eine gezielte Expression in im wesentlichen allen nicht-reproduktiven Blütengeweben zeigt, jedoch in den Pollen und Ovarien im wesentlichen keine Expression zeigt.

"Blüte" meint allgemein einen Spross begrenzten Wachstums, dessen Blätter zu Fortpflanzungsorganen umgewandelt sind. Die Blüte besteht aus verschiedenen "Blütengeweben" wie z.B. den Kelchblätter (Sepalen), den Kronblätter (Petalen), den Staubblätter (oder Staub"gefäß"; Stamina) oder den Fruchtblätter (Karpellen). Als Androeceum wird in der Blüte die Gesamtheit der Staubblätter (Stamina) bezeichnet. Die Staubblätter befinden sich innerhalb des Petalen- bzw. Sepalenkreises. Ein Staubblatt gliedert sich in ein Filament und eine am Ende sitzende Anthere. Diese wiederum unterteilt sich in zwei Theken, welche durch ein Konnektiv miteinander verbunden sind. Jede Theke besteht aus je zwei Pollensäcken, in denen der Pollen gebildet wird.

"Nicht-reproduktives Blütengewebe" meint alle Gewebe der Blüte bis auf den Pollen und die Ovarien.

- "Im wesentlichen alle nicht-reproduktiven Blütengewebe" meint in Bezug auf die nicht-reproduktiven Blütengewebe, dass einzelne dieser Gewebe insgesamt oder zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung keine wesentliche Expression aufweisen können, wobei der 5 Anteil dieser Gewebe jedoch bevorzugt weniger als 20 Gew%, bevorzugt weniger als 10 Gew.-%, besonders bevorzugt weniger als 5 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt weniger als 1 Gew% an dem Gesamtgewicht der nicht-reproduktiven Blütengeweben beträgt.
- 10 "Gezielt" meint in Bezug auf die Expression in nicht-reproduktiven Blütengeweben bevorzugt, dass die Expression unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren in den nicht-reproduktiven Blütengeweben bevorzugt mindestens das zehnfache, ganz besonders bevorzugt mindestens das fünfzigfache, am meisten bevorzugt mindestens das hundertfache beträgt als in einem anderen Gewebe, beispielsweise dem Pollen oder den Ovarien oder einem Nicht-Blütengewebe wie beispielsweise den Blättern.
- Dass die erfindungsgemäßen Promotoren "im wesentlichen keine 20 Expression in den Pollen und Ovarien zeigen", meint bevorzugt, dass die der statistischen Mittelwert der Expression über alle reproduktiven Blütengewebe maximal 10 %, bevorzugt maximal 5 %, am meisten bevorzugt maximal 1% des statistischen Mittelwerts der Expression über alle nicht-reproduktiven Blütengewebe unter den 25 gleichen Bedingungen beträgt.
- Bevorzugt ist die Expression innerhalb der nicht-reproduktiven Blütengewebe im wesentlichen konstant. "Im wesentlichen Konstant" bedeutet dabei bevorzugt, dass die Standardabweichung der Expression 30 zwischen den einzelnen nicht-reproduktiven Blütengeweben bezogen auf den statistischen Mittelwert der Expression über alle nicht-reproduktiven Blütengewebe geringer ist als 50 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 10 %, ganz besonders bevorzugt 5 %.
- 35 Bevorzugt ist die Expression innerhalb mindestens eines bestimmten nicht-reproduktiven Blütengewebes über alle Entwicklungsstufen der Blüte im wesentlichen konstant. "Im wesentlichen konstant" bedeutet dabei bevorzugt, dass die Standardabweichung der Expression zwischen den einzelnen Entwicklungszeitpunkten des jeweiligen nicht-reproduktiven Blütengewebes bezogen auf den statistischen Mittelwert der Expression über alle Entwicklungszeitpunkte geringer ist als 50 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 10 %, ganz besonders bevorzugt 5 %.
- 45 Bevorzugt werden im Rahmen der Ermittlung der Expressionshöhe solche Nukleinsäuresequenzen in funktioneller Verknüpfung mit dem zu prüfenden Promotor eingesetzt, die für leicht quantifizierbare

Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporterproteine (Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1): 29-44) wie "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques 5 23(5):912-8), Chloramphenicoltransferase, Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414),  $\beta$ -Glucuronidase oder  $\beta$ -Galactosidase. Ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).

- 10 "Ansonsten unveränderte Bedingungen" bedeutet, dass die Expression, die durch eine der zu vergleichenden transgenen Expressionskassetten initiiert wird, nicht durch Kombination mit zusätzlichen genetischen Kontrollsequenzen, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, modifiziert wird. Unveränderte Bedingungen bedeutet 15 ferner, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Pflanzenart, Entwicklungsstadium der Pflanzen, Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate etc.) zwischen den zu vergleichenden Expressionen identisch gehalten werden.
- 20 "Transgen" meint - zum Beispiel bezüglich einer Expressionskassette (oder einen diese umfassenden Expressionsvektor oder transgenen Organismus) alle solche durch gentechnische Methoden zu standegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder
- 25 a) der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder ein funktionelles Äquivalent desselben oder ein funktionell äquivalentes Teil der vorgenannten, oder
- b) eine mit a) funktionell verknüpfte weitere Nukleinsäure-  
30 sequenz, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden 35 oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Bevorzugt ist die in den Expressionskassetten enthaltene erfindungsgemäße Promotorsequenz (z.B. die 40 Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6) heterolog in Bezug auf die mit ihr funktionell verknüpfte, transgen zu exprimierende weitere Nukleinsäuresequenz. "Heterolog" meint in diesem Zusammenhang, dass die weitere Nukleinsäuresequenz nicht für das Gen 45 kodiert, das natürlicherweise unter der Kontrolle des besagten Promotors steht.

"Natürliche genetische Umgebung" meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäure-

- 5 sequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommendes Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des Promotors eines Gens kodierend für ein Protein gemäß SEQ ID NO: 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent desselben mit seinen entsprechenden kodierenden Sequenzen wird zu einem transgenen Expressionskonstrukt, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

"Transgen" meint in Bezug auf eine Expression ("transgene Expression") bevorzugt all solche unter Einsatz einer transgenen Expressionskassette, eines transgenen Expressionsvektors oder transgenen Organismus - entsprechend dem oben gegebenen Definitionen - realisierten Expressionen.

- 25 Funktionelle Äquivalente eines Promotors gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen eines Promotors gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 sowie homologe Sequenzen aus anderen Organismen, bevorzugt aus pflanzlichen Organismen, die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie 30 einer der Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 aufweisen.

Funktionelle Äquivalente umfasst auch all die Sequenzen, die von dem komplementären Gegenstrang der durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 definierten Sequenzen abgeleitet sind und im wesentlichen die 35 gleiche Promotoraktivität aufweisen.

Funktionelle Äquivalente zu den Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 umfasst bevorzugt solche Sequenzen die

- 40 a) im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie einer der Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 aufweisen und  
b) die eine Homologie aufweisen von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz eines der Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3, wobei sich die Homologie über

## 10

eine Länge von von mindestens 100 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 200 Basenpaaren, besonders bevorzugt von mindestens 300 Basenpaaren, ganz besonders bevorzugt von mindestens 400 Basenpaaren, am meistens bevorzugt von mindestens 500 Basen-  
5 paaren erstreckt.

Dabei kann die Expressionshöhe der funktionellen Äquivalente sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Vergleichswert abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen,  
10 deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten mit denen durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotoren  
15 unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten mit dem durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 beschriebenen Promotor übersteigt.  
20

Beispiele für die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Expressionsvektoren zum Einsatz  
25 kommenden Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthus annuus*, *Linum sativum* durch Homologievergleiche in Datenbanken leicht auffinden. Bevor-  
30 zugt kann man dazu von den kodierenden Regionen der Gene ausgehen, deren Promotoren durch SEQ ID NO 1, 2 oder 3 beschrieben sind. Ausgehend von beispielsweise den cDNA Sequenzen dieser Gene beschrieben durch SEQ ID NO: 16, 18 oder 20 oder den davon abgeleiteten Proteinsequenzen beschrieben durch SEQ ID NO: 17, 19  
35 oder 21 können die entsprechenden homologen Gene in anderen Pflanzenarten durch Durchmusterung von Datenbanken oder Genbanken (unter Verwendung von entsprechenden Gensonden) leicht in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

40 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für ein Protein mit einer Homologie von mindestens 60%, bevorzugt  
45 mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95 % zu dem Protein gemäß SEQ ID NO: 17 kodiert, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der be-

## 11

sagten genomischen Sequenz darstellen. Besonders bevorzugt umfas-  
sen funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ  
ID NO: 1 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen  
Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden,  
5 die für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA  
eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, be-  
sonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens  
95% zu der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 16 hat, wobei be-  
sagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomi-  
10 schen Sequenz darstellen. Bevorzugt sind Promotoren, die einen  
Sequenzbereich von mindestens 250 Basenpaaren, bevorzugt minde-  
stens 500 Basenpaaren, besonders bevorzugt 1000 Basenpaaren, am  
meisten bevorzugt mindestens 2000 Basenpaaren in 5'-Richtung  
gerechnet vom ATG-Startkodon der besagten genomischen Sequenzen  
15 umfassen. Besonders bevorzugt sind funktionelle Äquivalente des  
Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1 all solche Promotoren,  
die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor  
einer genomischen Sequenz befinden, die für ein Protein kodiert  
das mindestens eines der nachfolgenden Sequenzmotive enthält:

20

1. QPTDSCKISSE (SEQ ID NO: 32)
2. ETFFNMAKGAQLY (SEQ ID NO: 33)
3. ETIQFMTRIL (SEQ ID NO: 34)
4. NRSGLGDDTY (SEQ ID NO: 35)
- 25 5. PRCMLTSPPTPSM (SEQ ID NO: 36)
6. ELVIFGALNSLFKKTG (SEQ ID NO: 37)
7. GIVIVNCISLFN (SEQ ID NO: 38)
8. PNPSLSSMIVNR (SEQ ID NO: 39)
9. YKLKTDVKTYNLS (SEQ ID NO: 40)
- 30 10. MGCSAGAISVDLA (SEQ ID NO: 41)

Ganz besonders bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des  
Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 1 solche Promotoren, die  
sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer  
35 genomischen Sequenz befinden, welche für ein Protein kodiert,  
wobei besagtes Protein mindestens eine der nachfolgenden Sequen-  
zen umfasst:

1. der homologen Sequenz (H1) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 23

40

Am meisten bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promo-  
tors beschrieben durch SEQ ID NO: 1 solche Promotoren, die sich  
in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomi-  
schen Sequenz befinden, welche für eine Nukleinsäuresequenz  
45 kodiert, deren abgeleitete cDNA mindestens eine der nachfolgenden  
Sequenzen umfasst:

## 12

1. die homologen Sequenz (H1) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 22

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 2

- 5 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für ein Protein mit einer Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu dem Protein gemäß SEQ ID NO: 19
- 10 kodiert, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomischen Sequenz darstellen. Besonders bevorzugt umfassen funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 2 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz
- 15 befinden, die für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 18 hat, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der
- 20 besagten genomischen Sequenz darstellen. Bevorzugt sind Promotoren, die einen Sequenzbereich von mindestens 250 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 500 Basenpaaren, besonders bevorzugt 1000 Basenpaaren, am meisten bevorzugt mindestens 2000 Basenpaaren in 5'-Richtung gerechnet vom ATG-Startkodon der besagten genomischen
- 25 Sequenzen umfassen. Besonders bevorzugt sind funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 2 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für ein Protein kodiert das mindestens eines der nachfolgenden Sequenzmotive ent-  
30 hält:

- |                             |                 |
|-----------------------------|-----------------|
| 1. NGD(E/Q)VSRNIA           | (SEQ ID NO: 42) |
| 2. LAKHGC(R/K)LV            | (SEQ ID NO: 43) |
| 3. MGNEXSLRSXVDXIR          | (SEQ ID NO: 44) |
| 35 4. TYQGKXQDILXVS(Q/E)DEF | (SEQ ID NO: 45) |
| 5. IT(K/R)INLTAXWFXLKAVA    | (SEQ ID NO: 46) |

- Ganz besonders bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 2 solche Promotoren, die
- 40 sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche für ein Protein kodiert, wobei besagtes Protein mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

- 45 1. die homologe Sequenz (H2) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 25
2. die homologe Sequenz (H3) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 27

## 13

Am meisten bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 2 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

1. die homologe Sequenz (H2) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 24
2. die homologe Sequenz (H3) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 26

10

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 3 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für ein Protein mit einer Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt mindestens 80 %, besonders bevorzugt mindestens 90 %, am meisten bevorzugt mindestens 95 % zu dem Protein gemäß SEQ ID NO: 21 kodiert, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomischen Sequenz darstellen. Besonders bevorzugt umfassen funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 3 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für eine Nukleinsäuresequenz kodiert, deren abgeleitete cDNA eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90%, am meisten bevorzugt mindestens 95% zu der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 20 hat, wobei besagte Promotoren den natürlichen Promotor der besagten genomischen Sequenz darstellen. Bevorzugt sind Promotoren, die einen Sequenzbereich von mindestens 250 Basenpaaren, bevorzugt mindestens 500 Basenpaaren, besonders bevorzugt 1000 Basenpaaren, am meisten bevorzugt mindestens 2000 Basenpaaren in 5'-Richtung gerechnet vom ATG-Startkodon der besagten genomischen Sequenzen umfassen. Besonders bevorzugt sind funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 3 all solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, die für ein Protein kodiert das mindestens eines der nachfolgenden Sequenzmotive enthält:

- |    |                              |                 |
|----|------------------------------|-----------------|
| 40 | 1. AEPVCTXFL                 | (SEQ ID NO: 47) |
|    | 2. EGKDXFXSAHGMXXFE          | (SEQ ID NO: 48) |
|    | 3. EQFAXMFNXAM               | (SEQ ID NO: 49) |
|    | 4. ATXIMKK(V/I)LEVY(K/R)GFED | (SEQ ID NO: 50) |
|    | 5. TLVD(V/I)GGGXGT           | (SEQ ID NO: 51) |

45

## 14

Ganz besonders bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 3 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche für ein Protein kodiert,  
5 wobei besagtes Protein mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

1. die homologe Sequenz (H4) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 29
2. die homologe Sequenz (H5) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 31

10

Am meisten bevorzugt sind als funktionelle Äquivalente des Promotors beschrieben durch SEQ ID NO: 3 solche Promotoren, die sich in einem pflanzlichen Organismus in 5'-Richtung vor einer genomischen Sequenz befinden, welche für eine Nukleinsäuresequenz

15 kodiert, deren abgeleitete cDNA mindestens eine der nachfolgenden Sequenzen umfasst:

1. die homologe Sequenz (H4) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 28
2. die homologe Sequenz (H5) aus Raps gemäß SEQ ID NO: 30

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Polypeptide umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 oder 31 sowie die dafür kodierenden Nukleinsäuresequenzen, bevorzugt die Sequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 22, 25 24, 26, 28 oder 30 sowie die davon entsprechend der Degeneration des genetischen Kodes abgeleiteten Sequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz oder eines Teils derselben

30 in Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für besagte Nukleinsäuresequenz kodieren, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 oder 51  
35 oder eine für diese Sequenzen angegebene Variation umfasst. Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 40 26, 28 oder 30. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen.

Erfindungsgemäß umfasst sind ferner Verfahren zur Identifikation  
45 und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für einen Promotor mit Spezifität für nicht-reproduktive Blütengewebe kodieren, wobei bei der Identifikation und/oder Isolation mindestens eine

## 15

Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 5 oder 51 oder eine für diese Sequenzen angegebene Variation umfasst. Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 10 24, 26, 28 oder 30. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen. In einer bevorzugten Ausführungsform basiert das erfindungsgemäße Verfahren auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die 15 besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.

Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren bekannt, um ausgehend von einer Nukleinsäuresequenz (z.B. einem Gentranskript wie bei 20 spielsweise einer cDNA) den Promotor des entsprechenden Genes zu identifizieren und zu isolieren. Dazu stehen beispielsweise prinzipiell alle Methoden zur Amplifikation flankierender chromosomaler Sequenzen zur Verfügung. Die beiden am häufigsten genutzten Verfahren sind die inverse PCR ("iPCR"; schematisch dargestellt 25 in Fig. 10) und die "Thermal Asymmetric Interlaced PCR" ("TAIL PCR").

Für die "iPCR" wird genomische DNA des Organismus, aus dem der funktionell äquivalente Promotor zu isolieren ist, mit einem 30 gegebenen Restriktionsenzym komplett verdaut und anschließend werden in einem verdünnten Ansatz die einzelnen Fragmente rückligiert, also mit sich selbst zu einem ringförmigen Molekül verbunden. In der Vielzahl entstehender ringförmiger DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die die bekannte Sequenz (beispielsweise die Sequenz kodierend für das homologe Protein) enthalten. 35 Ausgehend davon kann das ringförmige Molekül mittels PCR amplifiziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem beide Primer sich an den bekannten Sequenzabschnitt anlagern können. Eine Ausführungsmöglichkeit für die "iPCR" ist beispielhaft in 40 Beispiel 6 wiedergegeben.

Die "TAIL-PCR" beruht auf der Verwendung von einerseits einem Satz sukzessive verkürzter hochspezifischer Primer, die sich an die bekannte genomische Sequenz (beispielsweise die Sequenz kodierend für das homologe Protein) anlagern, und andererseits 45 einem Satz kürzerer Zufallsprimer mit geringer Schmelztemperatur, so dass eine sequenzunspezifischere Anlagerung an die bekannte

## 16

genomische Sequenz flankierende genomische DNA erfolgt. Die Anlagerung der Primer an die zu amplifizierende DNA kann mit einer solchen Primerkombination so gestaltet werden, dass eine spezifische Amplifikation der gewünschten Zielsequenz möglich wird. Eine 5 Ausführungsmöglichkeit für die "TAIL-PCR" ist beispielhaft in Beispiel 5 wiedergegeben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für 10 nicht-reproduktive Blütengewebe, umfassend nachfolgende Schritte:

I. Isolation eines Promotors mit Spezifität für nicht-reproduktive Blütengewebe, wobei bei der Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben zum Einsatz

15 kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 oder 51 oder eine für diese Sequenzen angegebene Variation umfasst.

20 II. Funktionelle Verknüpfung besagten Promotors mit einer weiteren Nukleinsäuresequenz, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf den Promotor heterolog ist.

25 Bevorzugt kodiert besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29 oder 31. Besonders bevorzugt umfasst besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 oder 30. "Teil" meint in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz

30 bevorzugt eine Sequenz von mindestens 10 Basen, bevorzugt 15 Basen, besonders bevorzugt 20 Basen, am meisten bevorzugt 30 Basen. In einer Bevorzugten Ausführungsform basiert das erfindungsgemäße Verfahren auf der Polymerasekettenreaktion, wobei die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt 35 wird. Im Rahmen der funktionellen Verknüpfung können dem fachmann bekannte Verfahren wie z.B. Ligation etc. eingesetzt werden (s.u.).

"Mutation" meint Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder 40 Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen

45 Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzymeschnittstellen, die Entfernung überflüssiger DNA oder das Hinzufügen

17

fügen weiterer Sequenzen, zum Beispiel weiterer regulatorischer Sequenzen, sein.

Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B.

- 5 Transitionen und Transversionen, in Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Transition meint einen Basenpaaraustausch eines Purin/Pyrimidin-Paars in ein anderes Purin/Pyrimidin-Paar (z.B. A-T gegen G-C). Transversion  
10 meint einen Basenpaaraustausch eines Purin/Pyrimidin-Paars gegen ein Pyrimidin/Purin-Paar (z.B. A-T gegen T-A). Deletion meint die Entfernung eines oder mehrerer Basenpaare. Insertion meint die Einführung eines oder mehrerer Basenpaare.

15 Durch Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "blunt ends" können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. Zu analogen Ergebnissen kann man auch unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oli-  
20 gonukleotid-Primer kommen.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

30

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2.003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ\_ID

- 35** NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 50 % aufweist.

Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweilige Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

45

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 60 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 17 5 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 17 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 60 % aufweist.

Funktionelle Äquivalente meint ferner DNA Sequenzen, die unter 10 Standardbedingungen mit einer der Nukleinsäuresequenzen kodierend für einen der Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder der zu diesen komplementären Nukleinsäuresequenzen hybridisieren und die im wesentlichen gleichen Promotoreigenschaften haben.

15 Der Begriff der Standardhybridisierungsbedingungen ist breit zu verstehen und meint sowohl stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold 20 Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit 25 ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7.0). Darüber hinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten 30 Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agentien wie zum Beispiel 35 Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschritt sind infolge gegeben:

40 (1) Hybridisierungsbedingungen mit zum Beispiel

- a) 4X SSC bei 65°C, oder
- b) 6X SSC, 0,5% SDS, 100 µg/ml denaturierte, fragmentierte Lachssperma-DNA bei 65°C, oder
- 45 c) 4X SSC, 50% Formamid, bei 42°C, oder
- d) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung), oder

19

- e) 2X oder 4X SSC, 30 bis 40% Formamid bei 42°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 6x SSC bei 45°C, oder,
- g) 0,05 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 2 mM EDTA, 1% BSA und 7% SDS.

5

## (2) Waschschritte mit zum Beispiel

- a) 0,1X SSC bei 65°C, oder
- 10 b) 0,1X SSC, 0,5% SDS bei 68°C, oder
- c) 0,1X SSC, 0,5% SDS, 50% Formamid bei 42°C, oder
- d) 0,2X SSC, 0,1% SDS bei 42°C, oder
- e) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung), oder
- f) 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, 1% SDS, 2 mM EDTA.

15

Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer funktioneller Äquivalente umfassen bevorzugt die Einführung von Mutationen in einen der Promotoren gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3. Eine Mutagenese kann ungerichtet ("random") erfolgen, wobei die mutagenisierten Sequenzen anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften nach einer "trial-and-error" Prozedur durchmustert werden. Besonders vorteilhafte Selektionskriterien umfassen beispielsweise die Höhe der resultierenden Expression der eingeführten Nukleinsäuresequenz in einem nicht-reproduktiven Blütengewebe.

20

Verfahren zur Mutagenisierung von Nukleinsäuresequenzen sind dem Fachmann bekannt und schließen beispielhaft die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer oder mehr Mutationen im Vergleich zu der zu mutierenden Region ein (z.B. im Rahmen einer "site-specific mutagenesis"). Typischerweise kommen Primer mit ungefähr 15 bis ungefähr 75 Nukleotiden oder mehr zum Einsatz, wobei bevorzugt ca. 10 bis ca. 25 oder mehr Nukleotidreste an beiden Seiten der zu verändernden Sequenz lokalisiert sind. Details und Durchführung besagter Mutageneseverfahren sind dem Fachmann geläufig (Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol 154:367-382; Tomic et al. (1990) Nucl Acids Res 12:1656; Upender et al. (1995) Biotechniques 18(1):29-30; US 4,237,224). Eine Mutagenese kann auch durch Behandlung von beispielsweise transgenen Expressionsvektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, mit mutagenisierenden Agentien wie Hydroxylamin realisiert werden.

Alternativ können nicht-essentielle Sequenzen eines erfindungsgemäßen Promotors deletiert werden, ohne die genannten wesentlichen Eigenschaften signifikant zu beeinträchtigen. Derartige Deletionsvarianten stellen funktionell äquivalente Fragmente zu den Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 oder zu

## 20

funktionellen Äquivalentes derselben dar. Die Eingrenzung der Promotorsequenz auf bestimmte, essentielle regulatorische Regionen kann z.B. mit Hilfe von Suchroutine zur Suche von Promotorelementen vorgenommen werden. Oft sind in den für die Promotoraktivität relevanten Regionen bestimmte Promotorelemente gehäuft vorhanden. Diese Analyse kann beispielsweise mit Computerprogrammen wie dem Programm PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements"; Higo K et al. (1999) Nucl Acids Res 27(1): 297-300), der BIOBASE Datenbank "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig; Wingender E et al. (2001) Nucleic Acids Res 29(1):281-3) oder Datenbank PlantCARE (Lescot M et al. (2002) Nucleic Acids Res 30(1):325-7) vorgenommen werden.

Bevorzugt umfassen die funktionell äquivalenten Fragmente eines der erfindungsgemäßen Promotoren - beispielsweise der Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 - mindestens 200 Basenpaar, ganz besonders bevorzugt mindestens 500 Basenpaare, am meisten bevorzugt mindestens 1000 Basenpaare des 3'-Endes des jeweiligen erfindungsgemäßen Promotors - beispielsweise der Promotoren beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 -, wobei die Länge vom Transkriptionsstart ("ATG"-Kodon) in 5'-Richtung stromaufwärts gerechnet wird. Ganz besonders bevorzugte funktionell äquivalente Fragmente sind die Promotorsequenzen beschrieben durch SEQ ID NO: 4, 5 oder 6. Weitere funktionell äquivalente Fragmente können beispielsweise durch Deletion eventuell noch vorhandener 5'-untranslatierter Bereiche erzeugt werden. Zu diesem Zweck kann der Transkriptionsstart der entsprechenden Gene durch dem Fachmann geläufige Verfahren (wie beispielsweise 5'-RACE) bestimmt und die 5'-untranslatierten durch PCR-vermittelte Methoden oder Endonukleaseverdau deletiert werden.

In erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten steht mindestens einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6) in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6) mit einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer genetischer Kontrollsequenzen wie zum Beispiel einem Terminator oder einer Polyadenylierungssequenz derart, dass der Promotor seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz unter geeigneten Bedingungen erfüllen kann und die Expression der Nukleinsäuresequenz (d.h. Transkription und gegebenenfalls Translation) erfolgt. "Geeignete Bedingungen"

meint dabei bevorzugt das Vorliegen der Expressionskassette in einer pflanzlichen Zelle, bevorzugt einer pflanzlichen Zelle umfasst von einem nicht-reproduktiven Blütengewebe einer Pflanze.

- 5 Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter einem der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6) positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der
- 10 Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 15 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung eines transgenen Expressionskonstruktes kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold
- 20 Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY) und in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience beschrieben sind.
- 25 Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymeschnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann das transgene Expressionskonstrukt, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.
- 30
- 35 Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6), ohne dass er zuvor notwendigerweise mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft wurde, zum Beispiel
- 40 über eine gezielte homologe Rekombination oder eine zufällige Insertion in ein Wirtsgenom eingeführt wird, dort regulatorische Kontrolle über mit ihm dann funktionell verknüpfte endogene Nukleinsäuresequenzen übernimmt und die transgene Expression derselben steuert. Durch Insertion des Promotors - zum Beispiel
- 45 durch eine homologe Rekombination - vor eine für ein bestimmtes Polypeptid kodierende Nukleinsäure erhält man eine erfindungsgemäße Expressionskassette, die die Expression des bestimmten

Polypeptides selektiv in den nicht-reproduktiven Gweben der Blüte steuert. Auch kann beispielsweise der natürliche Promotor eines endogenen Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6) ausgetauscht 5 und so das Expressionsverhalten des endogenen Gens modifiziert werden.

Ferner kann die Insertion des Promotors auch derart erfolgen, dass antisense-RNA zu der für ein bestimmtes Polypeptid kodierende-  
10 den Nukleinsäure exprimiert wird. Damit wird selektiv die Expression des bestimmten Polypeptides in den nicht reproduktiven Organen der Blüte herrunterreguliert oder ausgeschaltet.

Analog kann auch eine transgen zu exprimierende Nukleinsäure-  
15 sequenz - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - hinter die Sequenz kodierend für einen der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. beschrieben durch SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6), die sich in ihrem natürlichen chromosomal Kontext befindet, so platziert werden, dass man eine erfindungsgemäße Expressionskassette  
20 erhält, die die Expression der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz in den nicht-reproduktiven Blütengeweben steuert.

Die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten können weitere genetische Kontrollsequenzen umfassen. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion einer erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten 3'-stromabwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz,  
35 sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressions-  
40 steuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasser-  
45 stress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991;

266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine transgene Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Promotoren kommen im Prinzip alle pflanzenspezifischen Promotoren in Frage. Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein. Bevorzugt sind konstitutive Promotoren, gewebespezifische Promotoren, entwicklungsabhängige Promotoren, chemisch-induzierbare stress-induzierbare oder pathogen-induzierbare Promotoren. Entsprechende Promotoren sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den Promotoren gram-positiver Bakterien wie amy und SPO2 oder in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH zu finden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)), bevorzugt der Gene mit dem Genlocus At2g46720, At3g01980 und At1g63140 aus *Arabidopsis thaliana*. Es kann gezeigt werden, dass derartige Regionen eine signifikante Funktion bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebsspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440). Die unter SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 angegebenen Nukleinsäuresequenzen repräsentieren jeweils die Promotorregion und die 5'-untranslatierte Regionen bis vor das ATG-

Startcodon der jeweiligen Gene mit dem Genlocus At2g46720,  
At3g01980 und At1g63140.

Das transgene Expressionskonstrukt kann vorteilhafterweise eine  
5 oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell ver-  
knüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene  
Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende  
der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können  
zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie  
10 weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die trans-  
gen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer  
oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind  
15 pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die  
im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobakterium*  
*tumefaciens*. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequen-  
zen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopa-  
lin-Synthase)-Terminator.

20 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die  
eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines  
Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom  
erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die  
25 kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen die  
für eine dsRNA kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden.  
Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebe-  
spezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung des trans-  
genen Expressionskonstruktes aus dem Genom des Wirtsorganismus  
30 (Sauer B (1998) Methods 14(4):381-92). Hier werden bestimmte  
flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die  
später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine transgene Expressionskassette und/oder die von ihm abgelei-  
35 teten transgenen Expressionsvektoren können weitere Funktionsele-  
mente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu ver-  
stehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Her-  
stellung, Vermehrung oder Funktion der erfundungsgemäßen transge-  
nen Expressionskonstrukte, der transgenen Expressionsvektoren  
40 oder der transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht  
einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen Biozide wie Meta-  
bolismusinhibitoren (z.B. 2-Desoxyglucose-6-phosphat;  
45 WO 98/45456), Antibiotika (z.B. Kanamycin, G 418, Bleomycin,  
Hygromycin) oder - bevorzugt - Herbizide (z.B. Phosphinotri-  
cin) verleihen. Als Selektionsmarker seien beispielhaft ge-

- nannt: Phosphinothricinacetyltransferasen (bar und pat Gen), welche Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren, 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasen (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, Glyphosat® degradierende Enzyme (gox-Genprodukt; Glyphosatoxidoreduktase), Dehalogenasen, welche z.B. Dalapon inaktivieren (deh Genprodukt), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie Nitrilasen, welche z.B. Bromoxynil degradieren (bxn Genprodukt), das aasa-Genprodukt, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, Streptomycinphosphotransferasen (SPT), die eine Resistenz gegen Streptomycin gewähren, Neomycinphosphotransferasen (NPTII), die eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleihen, das Hygromycinphosphotransferasen (HPT), die eine Resistenz gegen Hygromycin vermitteln, das Acetolactatsynthasen (ALS), die eine Resistenz gegen Sulfonlharnstoff-Herbizide verleihen (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).
- 20 b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β-Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die β-Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).
- 25 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen transgenen Expressionskonstrukte oder transgenen Expressionsvektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).
- 30 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
- 35 e) "Einführen" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet sind, eine Nukleinsäuresequenz (beispielsweise eine erfindungsgemäße Expressionskassette) direkt oder indirekt, in
- 40 f) g) h)
- 45 "Einführen" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet sind, eine Nukleinsäuresequenz (beispielsweise eine erfindungsgemäße Expressionskassette) direkt oder indirekt, in

einen Organismus (z.B. ein Pflanze) oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial (z.B. Samen oder Früchte) derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Das Einbringen kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz besagter Nukleinsäuresequenz führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen). Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation. Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet.

- Das Einführen einer erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen) kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskassetten enthalten sind. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Die transgenen Expressionskassetten können in den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionschnittstelle insertiert werden. Der entstandene Vektor kann zunächst in E.coli eingeführt und amplifiziert werden. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen.
- Restrikionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.
- Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA (z.B. der Expressionsvektor) oder RNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylen-glycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zum Einführen von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991)

- Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231;
- 5 DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).
- 10 Als Vektoren zur Expression in E.coli sind bevorzugt pQE70, pQE60 und pQE-9 (QIAGEN, Inc.); pBluescript Vektoren, Phagescript Vektoren, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene Cloning Systems, Inc.); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia Biotech, Inc.).
- 15 Bevorzugte Vektoren zur Expression in Säugerzellen umfassen pWLNE0, pSV2CAT, pOG44, pXT1 und pSG (Stratagene Inc.); pSVK3, pBPV, pMSG und pSVL (Pharmacia Biotech, Inc.). Als induzierbare Vektoren seien pTet-tTak, pTet-Splice, pcDNA4/TO, pcDNA4/TO /
- 20 LacZ, pcDNA6/TR, pcDNA4/TO/Myc-His /LacZ, pcDNA4/TO/Myc-His A, pcDNA4/TO/Myc-His B, pcDNA4/TO/Myc-His C, pVgRXR (Invitrogen, Inc.) oder die pMAM-Serie (Clontech, Inc.; GenBank Accession No.: U02443) zunennen. Diese stellen bereits das induzierbare regulatorische Kontrollelement beispielsweise für eine chemisch, indu-
- 25 zierbare Expression zur Verfügung.
- Vektoren für die Expression in Hefe umfassen beispielhaft pYES2, pYD1, pTEF1/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, PHIL-D2, PHIL-S1, pPIC3SK, pPIC9K, und PA0815 (Invitro-
- 30 gen, Inc.).
- Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation von Ciliaten und Algen sind dem Fachmann bekannt (WO 98/01572; Falciatore et al. (1999) Marine Biotechnology 1(3):239-251;
- 35 Dunahay et al. (1995) J Phycol 31:10004-1012).
- Prinzipiell sind für die Transformation tierischer Zellen oder von Hefezellen ähnliche Verfahren wie für die "direkte" Transformation von pflanzlichen Zellen anzuwenden. Insbesondere Verfahren
- 40 wie die Calciumphosphat oder Liposomen vermittelte Transformation oder aber Elektroporation sind bevorzugt.
- Verschiedene Methoden und Vektoren zum Einschleusen von Genen in das Genom von Pflanzen sowie zur Regeneration von Pflanzen aus
- 45 Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen sind bekannt (Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); White FF (1993) Vectors for Gene

- Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und Wu R, Academic Press, 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: 5 Kung und R. Wu, Academic Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225; Halford NG, Shewry PR (2000) Br Med Bull 56(1):62-73). Dazu zählen beispielhaft die oben erwähnten. Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus 10 Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Calciumphosphat-vermittelte Transformation, DEAE-Dextran-vermittelte Transformation, Liposomen vermittelte Transformation 15 (Freeman et al. (1984) Plant Cell Physiol. 29:1353ff; US 4,536,475), biolistische Verfahren mit der Genkanone ("particle bombardment" Methode; US 5,100,792; EP-A 0 444 882; EP-A 0 434 616; Fromm ME et al. (1990) Bio/Technology 8(9):833-9; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603), die Elektroporation, 20 die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, Elektroporation (EP-A 290 395, WO 87/06614), Mikroinjektion (WO 92/09696, WO 94/00583, EP-A 0 331 083, EP-A 0 175 966) oder andere Methoden der direkten DNA-Einführung (DE 4 005 152, WO 90/12096, US 4,684,611). Physische Methoden der DNA-Einführung 25 in pflanzliche Zellen sind im Überblick dargestellt bei Oard (1991) Biotech Adv 9:1-11.

Im Falle dieser "direkten" Transformationsmethoden sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe, pBR322, M13mp Reihe, pACYC184 etc. können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobakterium (z.B. EP 0 116 718), virale Infektion mittels viraler Vektoren (EP 0 067 553; US 4,407,956; WO 95/34668; WO 93/03161) oder mittels Pollen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4,684,611) durchgeführt werden.

Bevorzugt erfolgt die Transformation mittels Agrobakterien, die "entwaffnete" (disarmed) Ti-Plasmidvektoren enthalten, wobei 45 deren natürliche Fähigkeit zum Gentransfer auf Pflanzen genutzt wird (EP-A 0 270 355; EP-A 0 116 718).

Agrobakterium-Transformation ist weit verbreitet für die Transformation von Dicotyledonen, wird aber auch zunehmend auf Monocotyledonen angewandt (Toriyama et al. (1988) Bio/Technology 6: 1072-1074; Zhang et al. (1988) Plant Cell Rep 7:379-384; Zhang et al. (1988) Theor Appl Genet 76:835-840; Shimamoto et al. (1989) Nature 338:274-276; Datta et al. (1990) Bio/Technology 8: 736-740; Christou et al. (1991) Bio/Technology 9:957-962; Peng et al. (1991) International Rice Research Institute, Manila, Philippines 563-574; Cao et al. (1992) Plant Cell Rep 11:585-591; Li et al. (1993) Plant Cell Rep 12:250-255; Rathore et al. (1993) Plant Mol Biol 21:871-884; Fromm et al. (1990) Bio/Technology 8:833-839; Gordon-Kamm et al. (1990) Plant Cell 2:603-618; D'Halluin et al. (1992) Plant Cell 4:1495-1505; Walters et al. (1992) Plant Mol Biol 18:189-200; Koziel et al. (1993) Biotechnology 11:194-200; Vasil IK (1994) Plant Mol Biol 25:925-937; Weeks et al. (1993) Plant Physiol 102:1077-1084; Somers et al. (1992) Bio/Technology 10:1589-1594; WO 92/14828; Hiei et al. (1994) Plant J 6:271-282).

Die für die Agrobakterium-Transformation meist verwendeten Stämme 20 Agrobakterium tumefaciens oder Agrobakterium rhizogenes enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Ri Plasmid), das auf die Pflanze nach Agrobakterium-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Alternativ können durch Agrobakterium auch 25 binäre Vektoren (Mini-Ti-Plasmide) auf Pflanzen übertragen und in deren Genom integriert werden.

Die Anwendung von Agrobakterium tumefaciens für die Transformation von Pflanzen unter Verwendung von Gewebekulturexplantaten 30 ist beschrieben (u.a. Horsch RB et al. (1985) Science 225:1229ff.; Fraley et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 4803-4807; Bevans et al. (1983) Nature 304:184-187). Viele Stämme von Agrobakterium tumefaciens sind in der Lage, genetisches Material - beispielsweise die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 35 - zu übertragen, wie z.B. die Stämme EHA101[pEHA101], EHA105[pEHA105], LBA4404[pAL4404], C58C1[pMP90] und C58C1[pGV2260] (Hood et al. (1993) Transgenic Res 2:208-218; Hoekema et al. (1983) Nature 303:179-181; Koncz and Schell (1986) Gen Genet 204:383-396; Deblaere et al. (1985) Nucl Acids Res 13: 40 4777-4788).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären 45 Vektor. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet, die sowohl in E.coli als auch in Agrobakterium replizieren können. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder

Polylinker, flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobakterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobakterium sollte 5 bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobakterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht 10 und beschrieben (EP-A 0 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. 15 USA; Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711), pBinAR, pPZP200 oder pPTV.

Die mit einem solchen Vektor transformierten Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Raps, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschliessend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist beschrieben (White FF (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 15-38; Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic 20 Press, S.128-143; Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die integriert die oben beschriebenen erfindungsgemässen Expressionssysteme enthalten. 25

Stabil transformierte Zellen (d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten) können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker 30 kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen ein Biozid (z.B. ein Antibiotikum oder Herbizid (s.o.)) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Marker exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Biozids zu überleben, die einen 35 untransformierten Wildtyp abtöten. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen

## 31

tenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

5

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen, einzelnen Zellen (z.B. Protoplasten) oder

10 Blattscheiben aus (Vasil et al. (1984) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol I, II and III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press; Weissbach and Weissbach (1989) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press). Aus diesen noch undifferenzierten Kallus-Zellmassen kann die Bildung 15 von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533).

20

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristemvermehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression eines Zielgens und die Auswirkung auf den Phänotyp der Pflanze an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

35

Unter Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryotische oder eukaryotische Organismen, wie beispielsweise Mikroorganismen oder pflanzliche Organismen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

40

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung Escherichia, Erwinia, Agrobakterium, Flavobacterium, Alcaligenes, Pseudomonas, Bacillus oder Cyanobakterien zum Beispiel der Gattung Synechocystis und weitere in Brock Biology of Microorganisms Eighth Edition auf den Seiten A-8, A-9, A10 und A11 beschriebenen Bakteriengattungen.

Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfundungsgemässen Konstrukte befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismus sind solche aus der Gattung Agrobakterium und insbesondere der Art Agrobakterium turnefaciens. Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind solche, die zur Produktion von Toxinen (z.B. Botulinus Toxin), Pigmenten (z.B. Carotinoiden oder Flavonoiden), Antibiotika (z.B. Penicillin), Phenylpropanoiden (z.B. Tocopherol), Polyungesättigten Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure) oder Vitaminen (z.B. Vitamin B12) befähigt sind.

Bevorzugte Hefen sind Candida, Saccharomyces, Hansenula oder Pichia.

15 Bevorzugte Pilze sind Aspergillus, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

20 Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem pflanzliche Organismen.

"Pflanzlicher Organismus oder von diesem abgeleitete Zellen" meint allgemein jede Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut 25 (wie Samen oder Früchte) eines zur Photosynthese befähigten Organismus. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt.

30 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte), Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungs- 35 stadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive Organismen, wie zum Beispiel 45 Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung Haematococcus,

## 33

Phaedactylum tricornatum, Volvox oder Dunaliella. Insbesondere bevorzugt sind Synechocystis, Chlamydomonas und Scenedesmus.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind insbesondere pflanzliche Organismen bevorzugt ausgewählt aus der Gruppe der Blütenpflanzen (Phylum Anthophyta "Angiospermen"). Umfasst sind alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen. Bevorzugt ist die Pflanze aus nachfolgenden Pflanzenfamilien ausgewählt: Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiateae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanacea, Sterculiaceae, Tetragoniacea, Theaceae und Umbelliferae.

15

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt auf dikotyledone pflanzliche Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel den nachfolgenden

20

1) Kategorie: Dicotyledonae (Dicotyledonen). Bevorzugte Familien:

- Aceraceae (Ahornhölzer)

25

- Cactaceae (Kakteen)

- Rosaceae (Rosen, Äpfel, Mandeln, Erdbeeren)

30 - Salicaceae (Weiden)

- Asteraceae (Compositae) besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat), sowie Sonnenblume, Löwenzahn, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

35

- Cruciferae (Brassicaceae), besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea (z.B. Kohl, Blumenkohl oder Broccoli und weitere Kohlarten); und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana

40 sowie Kresse, Rettich, Canola und andere mehr,

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis, Gurken oder Zucchini und andere mehr,

45

## 34

- Leguminosae (Fabaceae) besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Lupine oder Erdnuss und andere mehr,

5 - Malvaceae insbesondere Malve, Baumwolle, eßbarer Eibisch, Hibiscus und andere mehr,

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und  
10 andere mehr,

- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine)  
15 und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Paprika), sowie Tabak, Petunie und andere mehr,

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,  
20

- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,

25 - Umbelliferae (Apiaceae), besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte)), Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Sellerie)) sowie Petersilie und andere mehr;

30 sowie Lein, Hanf, Flachs, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

Darüberhinaus sind jedoch auch monokotyle Pflanzen geeignet.

35 Bevorzugt sind diese ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel den Familien

- Arecaceae (Palmen)

- Bromeliaceae (Ananas, spanisches Moos)

40 - Cyperaceae (Seggen)

- Liliaceae (Lillien, Tulpen, Hyazinthen, Zwiebel, Knoblauch)

- Orchidaceae (Orchideen)

- Poaceae (Gräser, Bambusse, Mais, Zuckerrohr, Weizen)

- Iridaceae (Blenden, Gladiolen, Kroksusse)

Ganz besonders bevorzugt sind Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

- 5 Im Rahmen der erfindungsgemässen Expressionskassette kann die Expression einer bestimmten Nukleinsäure durch einen Promotor mit Spezifität für die nicht reproduktiven Organe der Blüte zu Bildung von sense-RNA, antisense RNA oder doppelsträngiger RNA in Form einer inversen Wiederholung (dsRNAi) führen. Die sense-RNA  
10 kann infolge in bestimmte Polypeptide translatiert werden. Mit der antisense-RNA und dsRNAi kann die Expression bestimmter Gene herunterreguliert werden.

Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA  
15 ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in  
20 den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen.

Die Spezifität der erfindungsgemässen Expressionskonstrukte und Vektoren für pflanzliche Blüten ist besonders vorteilhaft. Die  
25 Blüte hat eine Funktion im Anlocken von Nutzinsekten durch Pigmenteinlagerung oder Synthese flüchtiger Chemikalien.

Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze zum Beispiel gegen Pathogene unzureichend. Die Einführung fremder Gene  
30 aus Pflanzen, Tieren, oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiel sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne  
35 (Broglio et al. (1991) Science 254:1194-1197).

Kälteeinbrüche in der Blütezeit führen jedes Jahr zu erheblichen Ernteverlusten. Eine gezielte Expression schützender Proteine gezielt in der Blüteperiode kann einen Schutz gewähren.  
40

Für eine hohe Effizienz solcher gentechnischer Ansätze ist eine konzentrierte Expression der entsprechenden transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz vor allem in der äussersten Hülle der Blüte vorteilhaft. Eine konstitutive Expression in der gesamten  
45 Pflanze kann den Effekt zum Beispiel durch eine Verdünnung in Frage stellen oder das Wachstum der Pflanze bzw. die Qualität des Pflanzenproduktes beeinträchtigen. Außerdem kann es durch eine

konstitutive Expression verstärkt zum Abschalten des Transgens kommen ("gene silencing").

Hierzu sind Promotoren mit Spezifität für die Blüte vorteilhaft.

- 5 Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Proteinen bekannt, deren rekombinante Expression in der Blüte vorteilhaft sind. Ferner sind dem Fachmann eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren Reprimierung oder Ausschaltung mittels Expression einer entsprechenden antisense-RNA ebenfalls vorteilhafte Effekte erreicht
- 10 werden können. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend für vorteilhafte Effekte seien zu nennen: Das Erzielen einer Resistenz gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, Trockenheit, erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung) und biotische Stressfaktoren (Pathogene, Viren, Insekten und Krankheiten), die
- 15 Verbesserung von Nahrungs- oder Futtereigenschaften, die Verbeserung der Wachstumsrate oder des Ertrages, das Erzielen einer längeren oder früheren Blütezeit, die Veränderung oder Verstärkung des Duftes oder der Farbgebung der Blüten. Für die in diesen Anwendungen einsetzbaren Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptide
- 20 seien beispielhaft, aber nicht einschränkend, zu nennen:

1. Verbesserter UV-Schutz der pflanzlichen Blüte durch Veränderung der Pigmentierung durch Expression bestimmter Polypeptide wie Enzyme oder Regulatoren der Flavonoidbiosynthese (z.B. Chalconsynthasen, Phenylalaninammoniumlyasen), der DNA-Reparatur (z.B. Photolyasen; Sakamoto A et al. (1998) DNA Seq 9 (5-6):335-40), der Isoprenoidbiosynthese (z.B. Deoxxyxylulose-5-phosphatsynthasen), der IPP-Synthese oder der Carotinoidbiosynthese (z.B. Phytoensynthasen, Phytoendesaturasen, Lycopencyclasen, Hydroxylasen oder Ketolasen). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Chalconsynthase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: M20308), die 6-4 Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: BAB00748) oder das Blaulicht-Photorezeptor/Photolyase-Homolog (PHH1) aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: U62549) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
2. Verbesserter Schutz der pflanzlichen Blüte gegen abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, oder Kälte zum Beispiel durch Überexpression von dem "antifreeze"-Polypeptiden (z.B. aus *Myoxocephalus Scorpius*; WO 00/00512), dem *Arabidopsis thaliana* Transkriptionsaktivator CBF1, Glutamatdehydrogenasen (WO 97/12983, WO 98/11240), einem späten Embryogenesegen (LEA) zum Beispiel aus Gerste (WO 97/13843), Calcium-abhängigen Proteinkinasegenen (WO 98/26045), Calcineurinen (WO 99/05902), Farnesyltransferasen (WO 99/06580; Pei ZM et al. (1998) Science 282:287-290), Ferritin (Deak M et al.

- (1999) Nature Biotechnology 17:192-196), Oxalatoxidase (WO 99/04013; Dunwell JM (1998) Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 15:1-32), DREB1A-Faktor (dehydration response element B 1A; Kasuga M et al. (1999) Nature Biotechnology 17:276-286), Genen der Mannitol- oder Trehalosesynthese (z.B. Trehalosephosphatsynthetasen; Trehalosephosphatphosphatasen, WO 97/42326); oder durch Inhibition von Genen wie der Trehalase (WO 97/50561). Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den transkriptionellen Aktivator CBF1 aus Arabidopsis thaliana (Gen-Bank Acc.-No.: U77378) oder das "antifreeze"-Protein" aus Myoxocephalus octodecemspiniosus (GenBank Acc.-No.: AF306348) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
- 15 3. Erreichen einer Resistenz zum Beispiel gegen Pilze, Insekten, Nematoden und Krankheiten durch gezielte Absonderung oder Anreicherung bestimmter Metaboliten oder Proteine in der Blüte. Beispieldhaft seien genannt Glucosinolate (Nematodenabwehr), Chitininasen oder Glucaninasen und andere Enzyme, die die Zellwand von Parasiten zerstören, Ribosom-inaktivierende Proteine (RIPs) und andere Proteine der pflanzlichen Resistenz- und Stressreaktion, wie sie bei Verletzung oder mikrobiellen Befall von Pflanzen oder chemisch durch zum Beispiel Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert werden, Lysozym aus nicht-pflanzlichen Quellen wie zum Beispiel T4 Lysozym oder Lysozym aus verschiedenen Säugern, insektizide Proteine wie Bacillus thuringiensis Endotoxin,  $\alpha$ -Amylaseinhibitor oder Proteaseinhibitoren (cowpea Trypsininhibitor), Glucaninasen, Lektine (z.B. Phytohemagglutinin, Schneeglöckchenlectin, Weizenkeimagglutinin), RNAsen oder Ribozyme. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die chit42 Endochitinase aus Trichoderma harzianum (GenBank Acc.-No.: S78423) oder für das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450 (CYP79) aus Sorghum bicolor (GenBank Acc.-No.: U32624) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
4. Erreichen einer Insektenabwehr oder -anlockung zum Beispiel durch erhöhte Freisetzung flüchtiger Duft- oder Botenstoffe durch zum Beispiel Enzyme der Terpenbiosynthese.
- 40 5. Erreichen einer Speicherfähigkeit in Blütengeweben, die normalerweise keine Speicherproteine oder -lipide enthalten mit dem Ziel, den Ertrag an diesen Substanzen zu erhöhen, z.B. durch Expression einer Acetyl-CoA-Carboxylase oder von Enzymen zur Veresterung von Metaboliten. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Acetyl-CoA Carboxylase (Accase) aus Medi-

cago sativa (GenBank Acc.-No.: L25042) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

6. Expression von Transportproteinen, die die Aufnahme von Metaboliten, Nährstoffen oder Wasser in die Blüte verbessern und so das Blütenwachstum, die Metabolitenzusammensetzung oder den Ertrag optimieren, zum Beispiel durch Expression eines Aminosäuretransporters, der die Aufnahme von Aminosäuren beschleunigt, oder eines Monosaccharid-Transporters, der die Aufnahme von Zuckern fördert. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den kationische Aminosäure-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (GenBank Acc.-No.: X92657) oder für den Monosaccharid-Transporter aus *Arabidopsis thaliana* (Gen-Bank Acc. No.: AJ002399) oder funktionelle Äquivalente deselben kodieren.
7. Expression von Genen, die eine Akkumulation von Feinchemikalien, wie von Tocopherolen, Tocotrienolen, Phenylpropanoiden, Isoprenoiden oder Carotiniden, in der Blüte bewirken. Beispielsweise seien die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthetasen, Phytoensynthetasen, Lycopin- $\beta$ -cyklasen und die  $\beta$ -Carotinketolasen genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die *Haematoxillus pluvialis* NIES-144 (Acc. No. D45881) Ketolase oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
8. Modifikation der Wachsesterbildung oder der Zusammensetzung der eingelagerten Oligosaccharide zur Verbesserung des Schutzes gegen Umwelteinflüsse oder zur Verbesserung der Verdaubarkeit beim Einsatz in Futter- oder Nahrungsmitteln. Beispielsweise seien die Überexpression der Endoxyloglucantransferase genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Endo-xyloglucantransferase (EXGT-A1) aus *Arabidopsis thaliana* (Gen-Bank Acc.-No.: AF163819} oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.
9. Expression von Genen, DNA Bindeproteinen, dsRNA und antisense Konstruktionen, zur Veränderung der Blütenmorphologie, des Blühzeitpunktes und der Blütensesenz sowie des Blütenmetabolismus. Bevorzugt sind Konstruktionen, die die Anzahl der Petalen erhöhen z.B. durch Herunterregulation von AGAMOUS und dessen homologen Genen (Yanofsky MF et al. (1990) Nature 346:35-39) den Blühzeitpunkt verfrühen z.B. durch Herunterregulation von FLOWERING LOCUS C (FLC) (Tadege M et al. (2001) Plant J 28(5):545-53) oder verspäten z.B. durch Überexpression von FLC und die Seneszenz verzögern z.B. durch Vermittlung einer blütenpezifischen Ethyleninsensitivität.

10. Erzeugung von sterilen Pflanzen durch Verhinderung der Befruchtung und/oder der Keimung mit Hilfe der Expression eines geeigneten Inhibitors zum Beispiel eines Toxins in Blüten.

5 11. Produktion von Nutraceuticals wie zum Beispiel

a) Carotinoide und/oder Phenylpropanoide z.B. durch Optimierung der blüteneigenen Stoffwechselwege z.B. durch Expression von Enzymen und Regulatoren der Isoprenoidbiosynthese. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Chalconsynthase aus

10 Arabidopsis thaliana (GenBank Acc.-No.: M20308), die 6-4 Photolyase aus Arabidopsis thaliana (GenBank Acc.No.:BAB00748) oder den Blaulicht-Photorezeptor / Photolyase Homolog (PHH1) aus Arabidopsis thaliana (GenBank Acc.-No.: U62549) oder

15 funktionelle Äquivalente derselben kodieren. Ebenso bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für Enzyme und Regulatoren der Iso-

prenoidbiosynthese wie die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen und der Carotinoidbiosynthese wie die Phytoensynthasen, Lycopencyclasen und Ketolasen wie von Tocopherolen, Tocotrieno-

20 len, Phenylpropanoiden, Isoprenoiden oder Carotiniden, in der Blüte bewirken. Beispielhaft seien die Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen, Phytoensynthasen, Lycopencyclasen und die Caro-

25 tinketolasen genannt. Besonders devorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Haematoccus pluvialis, NIES-144 (Acc. No. D45881) Ketolase oder funktionelle Äquivalente kodieren.

b) Polyungesättigte Fettsäuren wie beispielsweise Arachidonsäure oder EP (Eicosapentaensäure) oder DHA (Docosahexaensäure) durch Expression von Fettsäureelongasen und/oder -desaturasen oder Produktion von Proteinen mit verbessertem Nahrungs-

30 rswert wie zum Beispiel mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (z.B. das methioninreiche 2S Albumingens der Brasilnuss). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für das

35 methioninreiche 2S-Albumin aus Bertholletia excelsa (GenBank Acc.-No.:AB044391), die Δ6-Acyllipiddesaturase aus Physcomitrella patens (GenBank Acc.-No.: AJ222980; Girke et al.

(1998) Plant J 15:39-48), die Δ6-Desaturase aus Mortierella alpina (Sakura-dani et al 1999 Gene 238:445-453), die Δ5-De-

40 saturase aus Caenorhabditis elegans (Michaelson et al. (1998) FEBS Letters 439:215-218), die Δ5-Fettsäuredesaturase (des-5) aus Caenorhabditis elegans (GenBank Acc.-No.: AF078796), die

Δ5-Desaturase aus Mortierella alpina (Michaelson et al. J Biol Chem 273:19055-19059), die Δ6-Elongase aus Caenorhabditis elegans (Beaudoin et al. (2000) Proc Natl. Acad. Sci.

45 97:6421-6426), die A6-Elongase aus Physcomitrella patens

40

(Zank et al. (2000,) Biochemical Society Transactions 28:654-657) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

11. Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern,  
5 Vakzinen, Hormonen und/oder Antibiotika wie z.B. beschrieben bei Hood EE & Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK & Vine ND (1999) CurrTop Microbiol Immunol 236:275-92.

10 Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM (2000) Transgenic approaches to crop improvement. J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der  
15 oben beschriebenen erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika  
20 oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen, wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressions-  
25 kassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder deren Biosynthese katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Ver-  
30 fahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden wie beispielsweise Astaxanthin. Die Züchtung der transfor-  
35 mierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorga-nismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann be-kannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Bei-spiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei Hood EE & Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10 (4)382-6; Ma JK & Vine ND  
40 (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 1942bp Fragment von Promotor (und ggf.  
5'-untranslatierter Region des Arabidopsis  
thaliana Genlocus At2g46720 (60L-Promotor)
2. SEQ ID NO: 2 2051bp Fragment von Promotor (und ggf.  
5'-untranslatierter Region des Arabidopsis  
thaliana Genlocus At3g01980 (76L-Promotor)
3. SEQ ID NO: 3 2192bp Fragment von Promotor (und ggf.  
5'-untranslatierter Region des Arabidopsis  
thaliana Genlocus At1g63140 (84L-Promotor)
- 15 4. SEQ ID NO: 4 Funktionell äquivalentes Fragment (1123 bp)  
von Promotor (und ggf. 5'-untranslatierter  
Region des Arabidopsis thaliana Genlocus  
At2g46720 (60S-Promotor)
- 20 5. SEQ ID NO: 5 Funktionell äquivalentes Fragment (1045 bp)  
von Promotor (und ggf. 5'-untranslatierter  
Region des Arabidopsis thaliana Genlocus  
At3g01980 (76S-Promotor)
- 25 6. SEQ ID NO: 6 Funktionell äquivalentes Fragment (1109 bp)  
von Promotor (und ggf. 5'-untranslatierter  
Region des Arabidopsis thaliana Genlocus  
At1g63140 (84L-Promotor)
- 30 7. SEQ ID NO: 7 Oligonukleotid-Primer 60assSmaI  
5'-CCCGGGTATAGAGATGGCGTTAACG-3'
8. SEQ ID NO: 8 Oligonukleotid-Primer 60ssSalI  
5'-GTCGACTACATGTGATCGTGTATGA-3'
- 35 9. Seq ID No: 9 Oligonukleotid-Primer 60slSalI  
5'-GTCGACCAGGCAGTTACAACCTTACA-3'
10. Seq ID No: 10 Oligonukleotid-Primer 76ssSmaI  
5'-CCCGGGTGCAAAGTAACCTTTAT-3'
- 40 11. Seq ID No: 11 Oligonukleotid-Primer 76assSalI  
5'-GTCGACAGGTGCATGACCAAGTAAC-3'
- 45 12. Seq ID No: 12 Oligonukleotid-Primer 76aslSalI  
5'-GTCGACTATCCTCTGCGCAATGAAT-3'

42

13. Seq ID No: 13 Oligonukleotid-Primer 84sSmaI  
5' -CCCGGGAAATCGAGAAAGATAGGTA-3'
14. Seq ID No: 14 Oligonukleotid-Primer 84assSalI  
5' -GTCGACAAAGGGTTATAGGAGACTG-3'
15. Seq ID No: 15 Oligonukleotid-Primer 84as1SalI  
5' -GTCGACCATGTTCAGAGGATATGT-3'
- 10 16. SEQ ID NO: 16 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für das  
Genprodukt des Arabidopsis thaliana  
Genlocus At2g46720
- 15 17. SEQ ID NO: 17 Aminosäuresequenz kodierend für das  
Genprodukt des Arabidopsis thaliana  
Genlocus At2g46720
18. SEQ ID NO: 18 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für das  
Genprodukt des Arabidopsis thaliana  
Genlocus At3g01980
- 20 19. SEQ ID NO: 19 Aminosäuresequenz kodierend für das  
Genprodukt des Arabidopsis thaliana  
Genlocus At3g01980
- 25 20. SEQ ID NO: 20 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für das  
Genprodukt des Arabidopsis thaliana  
Genlocus At1g63140
- 30 21. SEQ ID NO: 21 Aminosäuresequenz kodierend für das  
Genprodukt des Arabidopsis thaliana  
Genlocus At1g63140
- 35 22. SEQ ID NO: 22 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für  
Raps Homolog (H1) zum At2g46720 Genprodukt
23. SEQ ID NO: 23 Aminosäuresequenz kodierend für  
Raps Homolog (H1) zum At2g46720 Genprodukt
- 40 24. SEQ ID NO: 24 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für  
Raps Homolog (H2) zum At3g01980 Genprodukt
25. SEQ ID NO: 25 Aminosäuresequenz kodierend für  
Raps Homolog (H2) zum At3g01980 Genprodukt
- 45

43

26. SEQ ID NO: 26 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für  
Raps Homolog (H3) zum At3g01980 Genprodukt
27. SEQ ID NO: 27 Aminosäuresequenz kodierend für  
Raps Homolog (H3) zum At3g01980 Genprodukt
28. SEQ ID NO: 28 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für  
Raps Homolog (H4) zum At1g63140 Genprodukt
- 10 29. SEQ ID NO: 29 Aminosäuresequenz kodierend für  
Raps Homolog (H4) zum At1g63140 Genprodukt
30. SEQ ID NO: 30 Nukleinsäuresequenz (cDNA) kodierend für  
Raps Homolog (H5) zum At1g63140 Genprodukt
- 15 31. SEQ ID NO: 31 Aminosäuresequenz kodierend für  
Raps Homolog (H5) zum At1g63140 Genprodukt
- 20 32.-51 SEQ ID NO: 32 bis 51: Sequenzmotive für Proteine mit  
einer spezifischen Expression in den nicht reproduktiven  
Blütengewebe.

Abbildungen

- 25 Die in nachfolgenden Abbildungen verwendeten allgemeinen Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

GUS:	Reportergen (bakterielle $\beta$ -Glucuronidase)
Int:	Intron
30 NosT:	Terminatorsequenz der Nopalin-Synthase (NOS)
NptII:	BASTA Resistenz
NosP:	Promotorsequenz der Nopalin-Synthase (NOS)
AadA:	bakterielle Spectinomycin Resistenz

- 35 1. Fig. 1: Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Vektors pSUN3-60L-GUS. Weitere Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

60L: 60L-Promotor gemäß SEQ ID NO:1

- 40 2. Fig. 2: Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Vektors pSUN3-60s-GUS. Weitere Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

60s: 60L-Promotor gemäß SEQ ID NO:4

44

3. Fig. 3: Gezeigt eine schematische Darstellung des Vektors pSUN3-76L-GUS. Weitere Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

76L: 76L-Promotor gemäß SEQ ID NO: 2

5

4. Fig. 4: Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Vektors pSUN3-76S-GUS. Weitere Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

76S: 76S-Promotor gemäß SEQ ID NO: 5

10

5. Fig. 5: Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Vektors pSUN3-84L-GUS. Weitere Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

84L: 81L-Promotor gemäß SEQ ID NO: 3

15

6. Fig. 6: Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Vektors pSUN3-84S-GUS. Weitere Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

84S: 84S-Promotor gemäß SEQ ID NO: 6

20

7. Fig. 7: Protein-Sequenzvergleich zwischen SEQ ID NO: 17 Aminosäuresequenz (cDNA) kodierend für das Genprodukt des *Arabidopsis thaliana* Genlocus At2g46720 und einem cDNA Klon aus einer cDNA Bank aus *Brassica napus*.

25

8. Fig. 8: Protein-Sequenzvergleich zwischen SEQ ID NO: 19 Aminosäuresequenz (cDNA) kodierend für das Genprodukt des *Arabidopsis thaliana* Genlocus At3g01980 und einem cDNA Klon aus einer Blüten cDNA Bank aus *Brassica napus*

30

9. Fig. 9: Protein-Sequenzvergleich zwischen SEQ ID NO: 19 Aminosäuresequenz (cDNA) kodierend für das Genprodukt des *Arabidopsis thaliana* Genlocus At1g63140 und einem cDNA Klon aus einer Blüten cDNA Bank aus *Brassica napus*.

35

10. Schematische Darstellung der inverse PCR ("iPCR") Für die "iPCR" wird genomische DNA eines Zielorganismus mit der zu isolierenden Promotorsequenz mit einem gegebenen Restriktionsenzym komplett verdaut und anschließend werden in einem verdünnten Ansatz die einzelnen Fragmente rückligiert, also mit sich selbst zu einem ringförmigen Molekül verbunden. In der Vielzahl entstehender ringförmiger DNA-Moleküle befinden sich auch solche, die die bekannte Sequenz (d.h. die Sequenz kodierend für ein homologes Protein) enthalten. Ausgehend davon kann das ringförmige Molekül mittels PCR amplifiziert werden, indem ein Primerpaar verwendet wird, bei dem beide Primer sich an den bekannten Sequenzabschnitt anlagern

45

können. Abkürzungen: P - Promotorsequenz; CR - kodierende Region; L - Ligationsstelle; PCR - Polymerasekettenreaktion. Pfeile geben die Bindestelle potentieller Oligonukleotidprimer im Bereich der kodierenden Region wieder.

5

### Beispiele

#### Allgemeine Methoden:

- 10 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet & Voet (1995), 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klönnierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhr. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laser-fluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Pro Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).
- 25 Zur Herstellung transgener Arabidopsis Pflanzen wird Agrobakterium tumefaciens (Stamm C58C1 pMP90) mit verschiedenen Promoter-GUS Vektorkonstrukten transformiert. Die Agrobakterienstämme werden anschliessend zur Herstellung transgener Pflanzen verwendet. Dazu wird eine einzelne transformierte Agrobakterium Kolonie in einer 4 ml Kultur (Medium: YEB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 25 µg/ml Rifampicin über Nacht bei 28°C inkubiert. Mit dieser Kultur wird anschliessend eine 400 ml Kultur in demselben Medium angeimpft, über Nacht inkubiert (28 °C, 220 U/min) und abzentrifugiert (GSA-Rotor, 8.000 U/min, 20 min). Das Pellet wird in Infiltrationsmedium (1/2 MS-Medium; 0,5 g/l MES, pH 5,8; 50 g/l Saccharose) resuspendiert. Die Suspension wird in eine Pflanzenbox (Duchefa) eingebracht und 100 ml SILVET L-77. (mit Polyalkylenoxid modifiziertes Heptamethyltrisiloxan; Osi Special-ties Inc., Cat. P030196) wurde zu einer Endkonzentration von 0.02% hinzugegeben. Die Pflanzenbox mit 8 bis 12 Pflanzen wird in einem Exikator für 10 bis 15 Minuten einem Vakuum mit anschliessender spontaner Belüftung ausgesetzt. Dies wird 2 bis 3 Mal wiederholt. Hernach werden alle Pflanzen in Pflanztöpfe mit Feuchterde gepflanzt und unter Langtagbedingungen (16 h Beleuchtung) gezüchtet (Tagestemperatur 22 bis 24°C, Nachtemperatur 19°C; 65 % relative Luftfeuchte). Nach 6 Wochen werden die Samen geerntet.

Beispiel 1: Wachstumsbedingungen der Pflanzen für gewebsspezifische RT-PCR Analyse

Um 4 bzw. 7 Tage alte Keimlinge zu erhalten, werden jeweils ungefähr 400 Samen (*Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia) oberflächig mit einer 80%igen Ethanollösung für 2 Minuten sterilisiert, mit einer Natriumhypochloritlösung (0.5 % v/v) 5 Minuten behandelt, dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 4°C für 4 Tage inkubiert, um eine gleichmässige Keimung sicherzustellen. Anschliessend werden die Samen auf Petrischalen mit MS Medium (Sigma M5519) unter Zusatz von 1% Saccharose, 0.5 g/l MES (Sigma M8652), 0.8 % Difco-BactoAgar (Difco 0140-01), pH 5.7 inkubiert. Die Sämlinge werden in einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus (Philips 58W/33 Weisslichtlampen) bei 22°C gezüchtet und nach 4 bzw. 7 Tagen nach Beginn der Keimphase geerntet.

Für die Gewinnung von Wurzeln werden 100 Samen wie oben beschrieben sterilisiert, bei 4°C 4 Tage inkubiert und dann in 250ml Flaschen mit MS Medium (Sigma M5519) unter Zusatz von weiteren 3 % Saccharose und 0.5 g/l MES (Sigma M8652), pH 5.7 gezüchtet. Die Sämlinge werden in einem 16-stündigen Licht- / 8-stündigen Dunkelheitszyklus (Philips 58W/33 Weisslichtlampen) bei 22°C, 120 U/min gezüchtet und nach 3 Wochen geerntet. Für alle anderen verwendeten pflanzlichen Organe werden die Samen auf Einheitserde (Typ VM, Manna-Italia, Via S. Giacomo 42, 39050 San Giacomo/Laives, Bolzano, Italien) ausgesät, 4 Tage bei 4°C inkubiert um eine gleichmässige Keimung zu gewährleisten und dann in einem 16-stündigen Licht- / 8-stündigen Dunkelheitszyklus (OSRAM Lumenlux Daylight 36W/12 Leuchtstoffröhren) bei 22°C gezüchtet. Junge Rosettenblätter werden im 8-Blattstadium (nach 3 Wochen) geerntet, reife Rosettenblätter werden nach 8-Wochen kurz vor der Stengelbildung geerntet. Blütenstände (Apices) der ausschießenden Stengel werden kurz nach dem Ausschießen geerntet. Stengel, Stengelblätter und Blütenknospen werden in der Entwicklungsstufe 12 (Bowmann J (ed.), *Arabidopsis, Atlas of Morphology*, Springer New York, 1995) vor der Staubblattentwicklung geerntet. Geöffnete Blüten werden in Stadium 14 sofort nach der Staubblattentwicklung geerntet. Welkende Blüten werden in Stadium 15 bis 16 geerntet. Die verwendeten grünen und gelben Schoten hatten eine Länge von 10 bis 13 mm.

Beispiel 2: RNA Extraktion und cDNA Synthese

Gesamt-RNA wird aus den in Beispiel 1 beschriebenen Organen der Pflanze zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung wie beschrieben isoliert (Prescott A, Martin C (1987) *Plant Mol Biol*

Rep 4:219-224). Die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird verwendet, um die cDNA der Gentranskripte von At2g46720, AT3g01980 und At1G63140 nachzuweisen. Alle RNA Proben werden mit DNaseI (15 Units, Boehringer, Mannheim) vor der cDNA Synthese behandelt. Die Erststrang cDNA Synthese wird ausgehend von 6 µg Gesamt-RNA mit einem oligo-(dT) Primer und RT Super-script™II Enzym (300 Units) nach Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 20 µl (Life Technologies, Gaithersburg, MD) durchgeführt. Zur RNA werden dazu 150 ng "Random Hexamer Primer" in einem Endvolumen von 12 µl gegeben. Der Ansatz wird für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Dann werden 4 µl des 5X Erststrangpuffers, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und RNase Inhibitor (5 Units, Böhringer Mannheim) zugegeben. Der Ansatz wird für 2 min auf 42°C erhitzt, RT Superscript™II Enzym (300 Units, Life Technologies) zugegeben und für 50 min bei 42°C inkubiert.

#### Beispiel 3: Nachweis der gewebespezifischen Expression

20

Um die Eigenschaften des Promotors zu bestimmen und die essenziellen Elemente desselben, die seine Gewebespezifität ausmachen, zu identifizieren, ist es erforderlich, den Promotor selbst und verschiedene Fragmente desselben vor ein sogenanntes Reportergen zu setzen, das eine Bestimmung der Expressionsaktivität ermöglicht. Beispielhaft sei die bakterielle β-Glucuronidase genannt (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907). Die β-Glucuronidase Aktivität kann in planta mittels eines chromogenen Substrates wie 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronsäure im Rahmen einer Aktivitätsfärbung bestimmt werden (Jefferson et al. (1987) Plant Mol Biol Rep 5:387-405). Für die Untersuchungen der Gewebespezifität wird das pflanzliche Gewebe geschnitten, eingebettet, gefärbt und analysiert wie beschrieben (z.B. Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225:121-128).

35

Für die quantitative Aktivitätsbestimmung der β-Glucuronidase wird als Substrat MUG (Methylumbelliferylglucuronid) verwendet, das in MU (Methylumbelliferon) und Glucuronsäure gespalten wird. Unter alkalischen Bedingungen kann diese Spaltung quantitativ fluorometrisch verfolgt werden (Anregung bei 365 nm, Messung der Emission bei 455 nm; SpectroFluorimeter Thermo Life Sciences Fluoroscan) wie beschrieben (Bustos MM et al. (1989) Plant Gell 1:839-853).

## Beispiel 4: Klonierung der Promotoren

Um die vollständigen Promotoren gemäß Seq ID NO: 1, 2 oder 3 zu isolieren, wird genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Landsberg erecta) extrahiert wie beschrieben (Galbiati M et al. Funct. Integr Genozides 2000, 20 1:25-34). Die isolierte DNA wird als Matrizen-DNA in einer PCR unter Verwendung folgender Primer eingesetzt:

	Promotor	Forward Primer	Reverse Primer
10	60L (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO: 7 (60s)	SEQ ID NO: 9 (60as1)
	76L (SEQ ID NO:2)	SEQ ID NO: 10 (76s)	SEQ ID NO: 12 (76as1)
	84L (SEQ ID NO:3)	SEQ ID NO: 13 (84s)	SEQ ID NO: 15 (84as1)
15	60s (SEQ ID NO:4)	SEQ ID NO: 7 (60s)	SEQ ID NO: 8 (60ass)
	76s (SEQ ID NO:5)	SEQ ID NO: 10 (76s)	SEQ ID NO: 11 (76ass)
	84s (SEQ ID NO:6)	SEQ ID NO: 13 (84s)	SEQ ID NO: 14 (84ass)

Die Amplifikation wird wie folgt durchgeführt:

- 20        80 ng genomische DNA  
           1X Expand™ Long Template PCR Puffer  
           2,5 mM MgCl<sub>2</sub>,  
           je 350 µM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP  
           je 300 nM eines jeden Primers -(SEQ ID NO: 7 und 9 für Promoter 60L, SEQ ID NO: 10 und 12 für Promoter 76L und SEQ ID NO 13 und 15 für Promoter 84s)  
           2,5 Units Expand™ Long Template Polymerase (Roche Diagnostics).  
           in einem Endvolumen von 25 µl

30        Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet (PTC-100TM Modell QfiV; MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts):

- 1        Zyklus mit 120 sec bei 94°C  
  35      35 Zyklen mit 94°C für 10 sec, 55°C für 30 sec und 68°C für 3min.  
         1 Zyklus mit 68°C für 30 min 45

40        Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonucleasen SmaI und SalI geschnitten und in den Vektor pSUN::GUS kloniert. Die resultierenden Konstrukte sind pSUN3-60L::GUS (Fig.7), pSUN3-60S::GUS (Fig.8), pSUN3-76L::GUS (Fig.9), pSUN3-76S::GUS (Fig.10), pSUN3-84L::GUS (Fig.11) und pSUN3-84S::GUS (Fig.11). Nach der stabilen Transformation dieser Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* kann RNA aus den verschiedenen Geweben gewonnen werden und die Expression des GUS Gens mittels RT PCR qualitativ und mittels real time PCR quantitativ dargestellt werden.

## Beispiel 5: TAIL-PCR

Die "TAIL-PCR" wird entsprechend einem adaptierten Protokoll der Methode von Liu et al. (1995) Plant J 8(3):457-463 und Tsugeki 5 et al. (1996) Plant J 10(3):479-489 durchgeführt (vgl. Fig. 9). Für eine erste PCR-Reaktion wird folgender Mastermixes (Angaben pro Reaktionsansatz) eingesetzt

- 11 µl steriles H<sub>2</sub>O (bidestilliert)  
10 2 µl Primer-Stocklösung des spezifischen Primers 1 (5mM)  
3 µl AD2 Primer-Stocklösung (20mM)  
2 µl 10x-PCR-Puffer  
2 µl 10xdNTP  
0,2 µl Taq Polymerase

- 15 19 µl dieses Mastermixes werden in einem PCR-Gefäß zu 1 µl einer Präparation genomischer DNA des jeweiligen Zielorganismus (Präparation gemäß Galbiati M et al. (2000) Funct Integr Genozides 20(1):25-34)) hinzupipettiert und durch Pipettieren gut gemischt.  
20 Die primäre PCR-Reaktion wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 94°C für 1 min
- 25 - Vier Zyklen mit 94°C für 10s, 62°C für 1 min und 72°C für 150s
- 94°C für 10s, 25°C für 3 min, 0,2°C/s bis 72°C und 72°C für 150s
- 30 - Vierzehn Zyklen mit 94°C für 10s, 69°C für 1min, 72°C für 150s, 94°C für 10s, 68°C für 1 min, 72°C für 150s, 94°C für 10s, 44°C für 1 min und 72°C für 150s
- 72°C für 5 min, dann 4°C bis zur Weiterverwendung.

- 35 Das Produkt der PCR-Reaktion wird 1:50 verdünnt und je 1 µl jeder verdünnten Probe wird für eine zweite PCR-Reaktion (sekundäre PCR) verwendet. Dazu wird folgender Mastermix (Angaben pro Reaktionsansatz) eingesetzt:

- 40 12 µl steriles H<sub>2</sub>O (bidestilliert)  
2 µl 10x-PCR-Puffer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)  
2 µl 10xdNTP  
2 µl Primer-Stocklösung des spezifischen Primers 2 (5 mM)  
45 2 µl AD2 Primer-Stocklösung  
0,2µl Taq Polymerase

## 50

Je 20,2 µl des zweiten Mastermix werden zu je 1 µl des 1:50 verdünnten primären PCR-Produktes gegeben und die sekundäre PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 5 - 11 Zyklen mit 94°C für 10s, 64°C für 1 min, 72°C für 150s,  
94°C für 10s, 64°C für 1 min, 72°C für 150s, 94°C für 10s, 44°C  
für 1 min, 72°C für 150s,  
- 72°C für 5min, dann 4°C bis zur Weiterverwendung.

10

Das PCR-Produkt der vorhergehenden Reaktion wird 1:10 verdünnt und je 1 µl jeder verdünnten Probe wird für eine dritte PCR-Reaktion (tertiäre PCR) verwendet. Dazu wird folgender Mastermix (Angaben pro Reaktionsansatz) eingesetzt:

15

- 18 µl steriles H<sub>2</sub>O (bidestilliert)  
3 µl 10x-PCR-Puffer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)  
3 µl 10xdNTP  
3 µl Primer-Stocklösung des spezifischen Primers 3 (5mM)  
20 3 µl AD2 Primer-Stocklösung  
0,5 µl Taq Polymerase

Je 30,3 µl dieses Mastermixes werden zu je 1 µl des 1:10 verdünnten sekundären PCR-Produktes gegeben und die tertiäre PCR wird 25 unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 19 Zyklen mit 94°C für 15s, 44°C für 1 min, 72°C für 150s,  
- 72°C für 5 min, dann 4°C bis zur Weiterverwendung.

30

Von den Produkten der PCR 1, 2 und 3 jeder Probe werden je 5 µl auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Diejenigen PCR-Produkte, die wegen der versetzten spezifischen Primer die erwartete Größenverringerung aufweisen, werden bei Bedarf aus dem Gel gereinigt und mit dem zuletzt verwendeten Primerpaar erneut amplifiziert und sequenziert.

## Reagenzien:

Taq-Polymerase 5U/µl

- 40 10x PCR-Puffer (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>)  
10x dNTP-Stocklösung: 2 mM

## Primer:

Degenerierte Zufallsprimer (Stocklösungen 20 µM):

- 45 AD1: 5'-NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT-3'  
AD2: 5'-NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA-3'  
AD5: 5'-(A/T)CAGNTG(A/T)TNGTNCTG-3'

51

Beispiel 6: Inverse PCR (iPCR) für die Amplifikation Insert-flankierender DNA

Die "iPCR" wird entsprechend einem adaptierten Protokoll der  
5 Methode von Long et al. (1993) PNAS 90:10370 (vgl. Fig.8) durchgeführt:

1. Restriktion von ca. 2 µg genomischer DNA mit *Bst*YI für ca. 2h bei 37°C in einem Volumen von insgesamt 50 µl.
- 10 2. Ligation von 25 µl des Restriktionsansatzes in einem Gesamtvolumen von 300 µl mit 3U T4-DNA-Ligase bei 15°C über Nacht.
- 15 3. Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Chloroform Extraktion des Ligationsansatzes. Nach Ethanolfällung DNA in 10 µl sterilem H<sub>2</sub>O (bidestilliert) aufnehmen.
- 20 4. Für die PCR 2,5µl der DNA-Lösung einsetzen

Reaktionsansatz:

2,5 µl der DNA-Lösung  
10 µl 10x PCR-Puffer  
25 2 µl dNTP (je 10mM im Gemisch)  
5 µl Primer 1 (25pmol)  
5 µl primer 2 (25pmol))  
1,5 µl Taq-Polymerase  
74 µl H<sub>2</sub>O (bidestilliert, steril)  
30 auf 100 µl Gesamtvolumen

PCR-Protokoll: 4 min für 94°C. Dann 35 Zyklen mit 1 min für 94°C, 2 min für 55°C und 3 min für 72°C. Abschließend 8 min für 72°C, dann 4°C bis zur Weiterverwendung.

35 Das PCR-Produkt wird per Gelelektrophorese kontrolliert, aufreinigt und anschließend als PCR-Produkt sequenziert.

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nuklein-  
5 säuresequenzen in nicht-reproduktiven Blütengeweben von  
Pflanzen, wobei nachfolgende Schritte umfasst sind
  - I. Einbringen einer transgenen Expressionskassette in  
10 pflanzliche Zellen, wobei die transgene Expressions-  
kassette mindestens nachfolgende Elemente enthält
    - a) mindestens eine Promotorsequenz ausgewählt aus der  
Gruppe von Sequenzen bestehend aus
      - i) den Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder  
15 3 und
      - ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen  
gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 mit im wesentlichen  
20 der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor  
gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 und
      - iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequen-  
25 zen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der  
gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor ge-  
mäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3
  - und
  - 30 b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und
  - c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,  
wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere  
35 Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft  
sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die  
Promotorsequenz heterolog ist, und
  - II. Auswahl von transgenen Zellen, die besagte Expressions-  
40 kassette stabil in das Genom integriert enthalten, und

45

0817/631/2002 Ko/fr 03.09.2002

Fig.+ Sequenzen

- III. Regeneration von vollständigen Pflanzen aus besagten transgenen Zellen, wobei mindestens eine der weiteren Nukleinsäuresequenz in im wesentlichen allen nicht-reproduktiven Blütengeweben jedoch im wesentlichen nicht im Pollen und den Ovarien exprimiert wird.
- 5 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das funktionell äquivalente Fragment eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 4, 5 oder 6 umfasst.
- 10 3. Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren von Genen, die für einen Promotor mit Spezifität für nicht-reproduktive Blütengewebe kodieren, wobei bei der Identifikation und/oder Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben zum Einsatz kommt, wobei 15 besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 oder 51 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 oder 30 umfasst.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 oder 4, wobei das Verfahren unter Einsatz der Polymerasenkettenreaktion durchgeführt wird und die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.
- 25 6. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Expressionskassette mit Spezifität für nicht-reproduktive Blütengewebe, umfassend nachfolgende Schritte:
- 30 I. Isolation eines Promotors mit Spezifität für nicht-reproduktive Blütengewebe, wobei bei der Isolation mindestens eine Nukleinsäuresequenz oder ein Teils derselben zum Einsatz kommt, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 oder 51 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.
- 35 II. Funktionelle Verknüpfung besagten Promotors mit einer weiteren Nukleinsäuresequenz, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in Bezug auf den Promotor heterolog ist.
- 40
- 45

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 oder 30 umfasst.
- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 oder 7, wobei das Verfahren unter Einsatz der Polymerasenkettenreaktion durchgeführt wird und die besagte Nukleinsäuresequenz oder ein Teil derselben als Primer eingesetzt wird.
- 10 9. Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29 oder 31.
10. Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid gemäß Anspruch 9.  
15
11. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 10, umfassend eine Sequenz ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 22, 24, 26, 28 und 30 sowie den davon entsprechend der Degeneration des genetischen Kodes abgeleiteten Sequenzen.  
20
12. Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz oder eines Teils derselben in Verfahren zur Identifikation und/oder Isolation von Promotoren mit Spezifität für die nicht-reproduktive Blütengewebe, wobei besagte Nukleinsäuresequenz für eine  
25 Aminosäuresequenzen kodiert, die mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 oder 51 oder eine Variation dieser Sequenzen umfasst.  
30
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei besagte Nukleinsäuresequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 oder 30 umfasst.  
35
14. Transgene Expressionskassette zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in nicht-reproduktiven Blütengeweben von Pflanzen, umfassend
  - a) mindestens eine Promotorsequenz ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzen bestehend aus  
40
    - i) den Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 und

4

ii) funktionellen Äquivalenten der Promotorsequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3 und

5

iii) funktionell äquivalenten Fragmenten der Sequenzen unter i) oder ii) mit im wesentlichen der gleichen Promotoraktivität wie ein Promotor gemäß SEQ ID NO: 1, 2 oder 3

10

und

b) mindestens eine weitere Nukleinsäuresequenz, und

15

c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Promotorsequenz und eine weitere Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Promotorsequenz heterolog ist.

20

15. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 14, wobei das funktionell äquivalente Fragment eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 4, 5 oder 6 umfasst.

25

16. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 14 oder 15, wobei

a) die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen funktionell verknüpft ist, oder

b) die Expressionskassette zusätzliche Funktionselemente enthält, oder

30

c) a) und b) gegeben sind.

17. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüchen 14 bis 16, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz

40

a) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierten Proteins, oder

b) die Expression eines von besagter Nukleinsäuresequenz kodierter sense-RNA, anti-sense-RNA oder doppelsträngigen RNA ermöglicht.

45

18. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 14 bis 17, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe von Nukleinsäuresequenzen kodierend für Chalconsynthasen, Phenylalaninammoniumlyasen, Photolyasen, Deoxyxylulose-5-phosphatsynthasen, Phytoensynthasen, Phytoendesaturasen, Lycopencyclasen, Hydroxylasen, "antifreeze"-Polypeptide, CBF1-Transkriptionsaktivatoren, Glutamatdehydrogenasen, Calcium-abhängigen Proteinkinasen, Calcineurin, Farnesyltransferasen, Ferritin, Oxalatoxidasen, DREB1A-Faktor, Trehalosephosphatphosphatasen, Chitinases, Glucanases, Ribosom-inaktivierende Protein, Lysozyme, *Bacillus thuringiensis* Endotoxine, Amylaseinhibitoren, Proteaseinhibitoren, Lectinen, RNAsen, Ribozymen, Endochitinase, Cytochrom P-450, Acetyl-CoA Carboxylasen, Aminosäure-Transporter, Monosaccharid-Transporter, Lycopencyklasen, Carotinketolasen, Endoxylglucantransferasen, Δ6-Acyllipiddesaturasen, Δ6-Desaturasen, Δ5-Fettsäuredesaturase, Δ6-Elongasen und IPP-Isomerasen.
19. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 14 bis 18, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe von Nukleinsäuresequenzen beschrieben durch GenBank Acc.-No.: M20308, BAB00748, U62549, U77378, S78423, U32624, L25042, X92657, AJ002399, D45881, AF163819, AB044391, AJ222980 und AF078796.
20. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 14 bis 19.
21. Transgener Organismus transformiert mit einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 14 bis 19 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 20.
22. Transgener Organismus nach Anspruch 21 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, nicht-menschlichen tierischen und pflanzlichen Organismen oder von diesen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut.
23. Transgener Organismus nach Anspruch 21 oder 22 ausgewählt aus der Gruppe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen.
24. Verwendung eines transgenen Organismus nach einem der Ansprüche 21 bis 23 oder von diesem abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

6

25. Verfahren zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in transgenen Organismen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 oder von diesem abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut, wobei  
5 der transgene Organismus oder von diesem abgeleitete abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile, Gewebe, Organe oder Vermehrungsgut gezüchtet oder kultiviert werden und das gewünschte Pharmazeutikon oder die gewünschte Feinchemikalie isoliert werden.

10

15

20

25

30

35

40

45

Transgene Expressionskassetten zur Expression von Nukleinsäuren  
in nicht-reproduktiven Blütengeweben von Pflanzen

5

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren zur gezielten, transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in nicht-reproduktiven Blüten-  
geweben von Pflanzen, sowie transgene Expressionskassetten und  
Expressionsvektoren, die Promotoren mit einer Expressionsspezifi-  
tät für nicht-reproduktive Gewebe der Blüte enthalten. Die Erfin-  
dung betrifft ferner mit diesen transgenen Expressionskassetten  
oder Expressionsvektoren transformierte Organismen (bevorzugt  
Pflanzen), davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut,  
sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-,  
Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

20

25

30

35

40

45

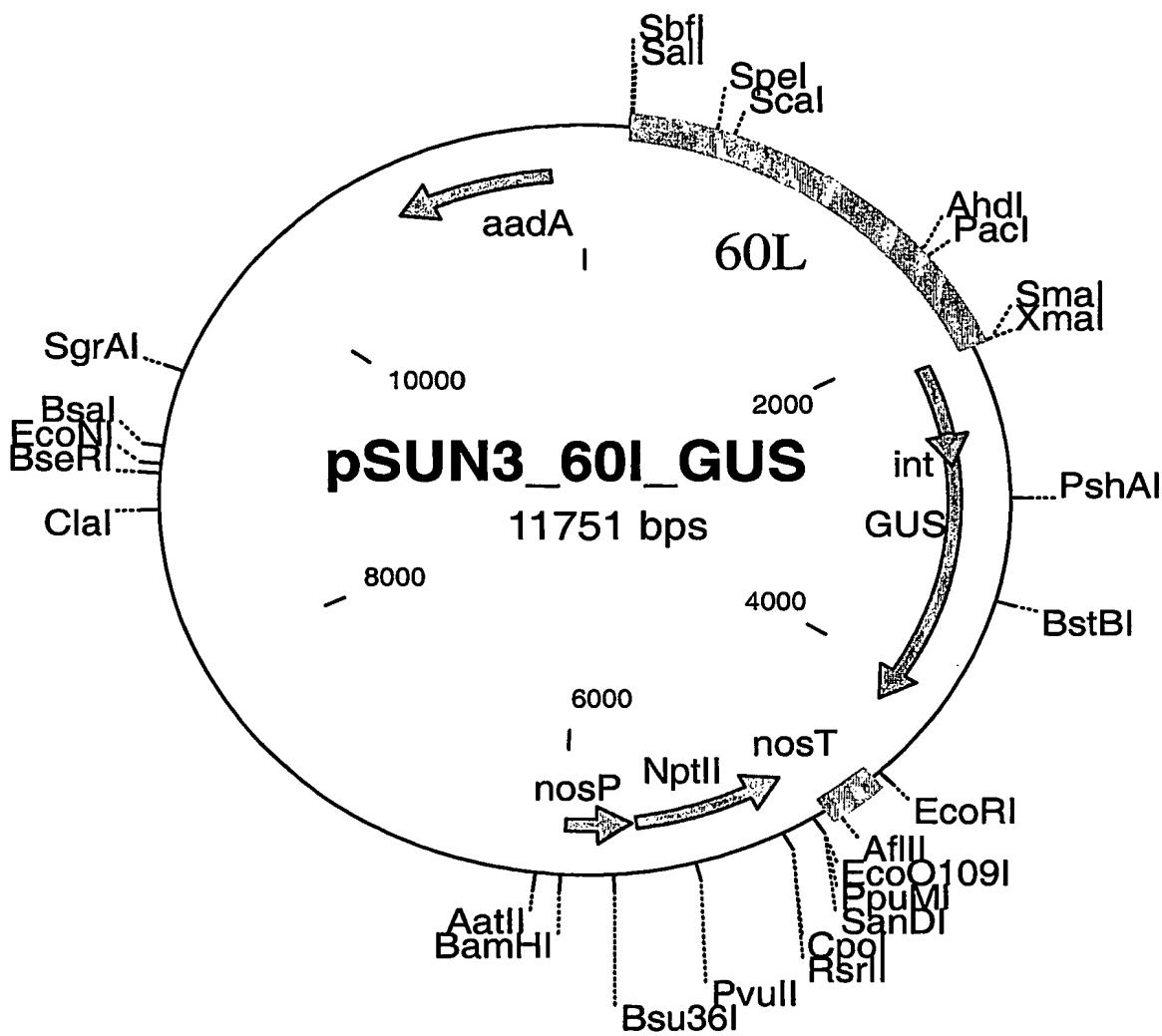


Fig. 1

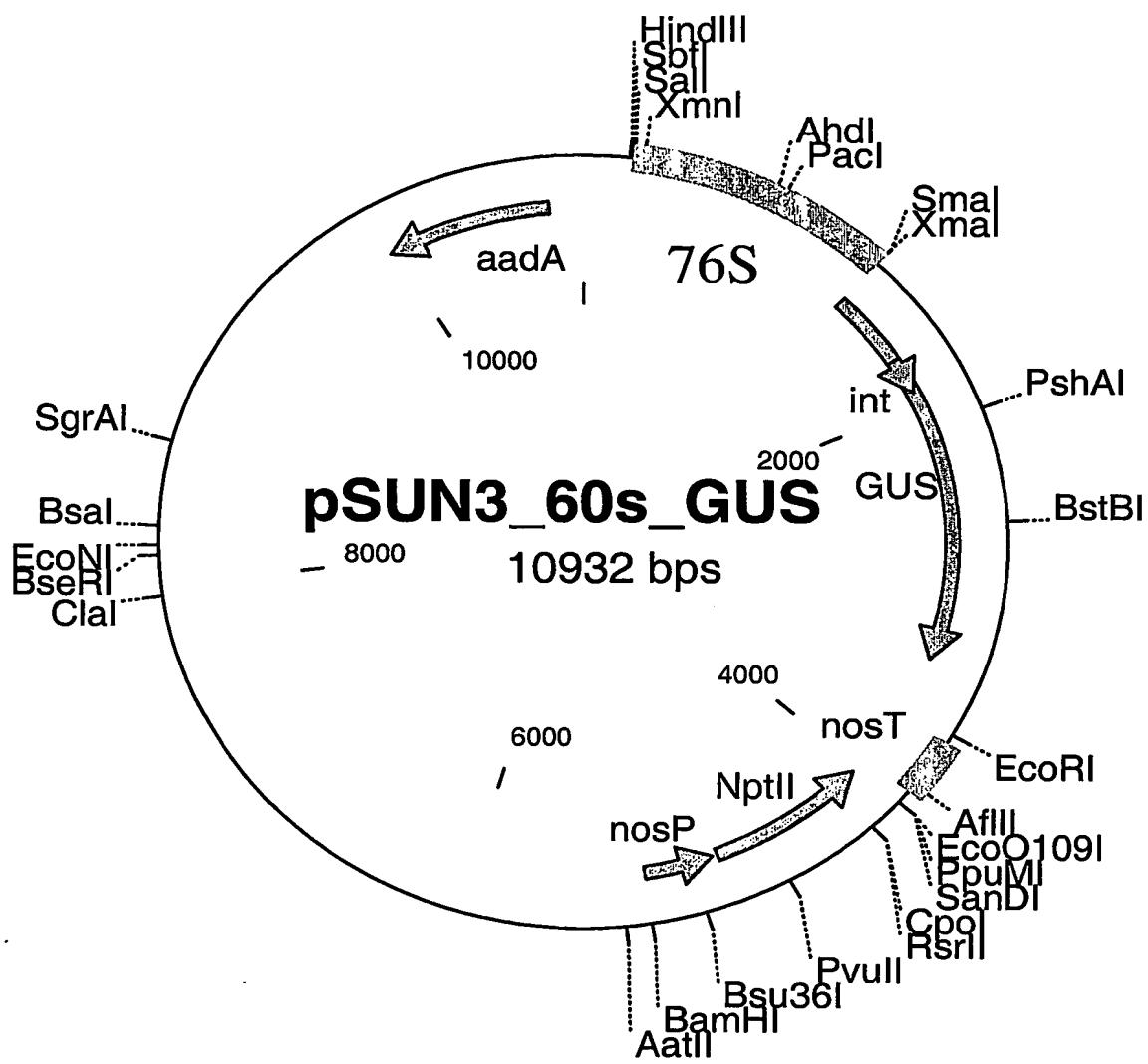


Fig. 2

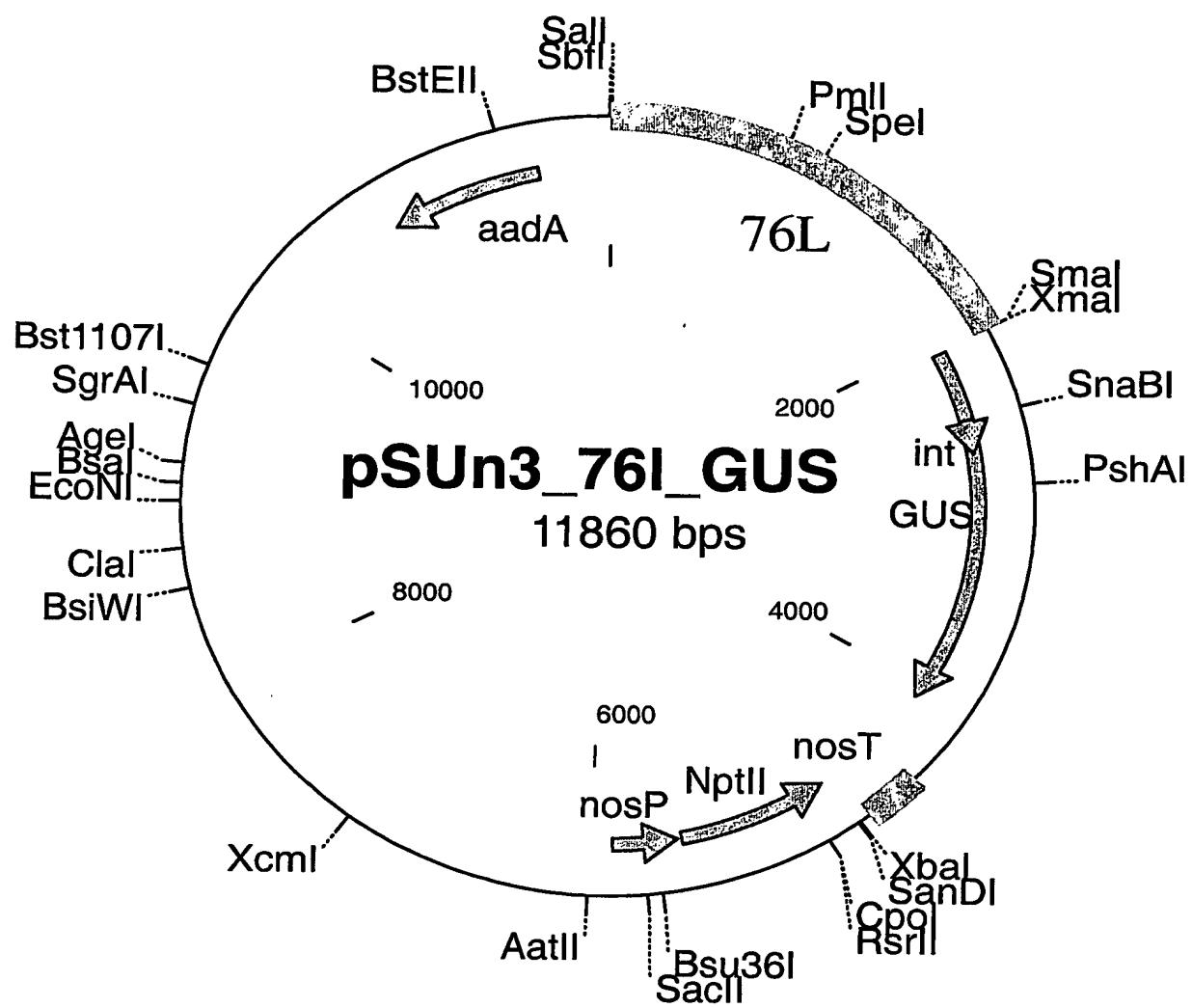


Fig. 3

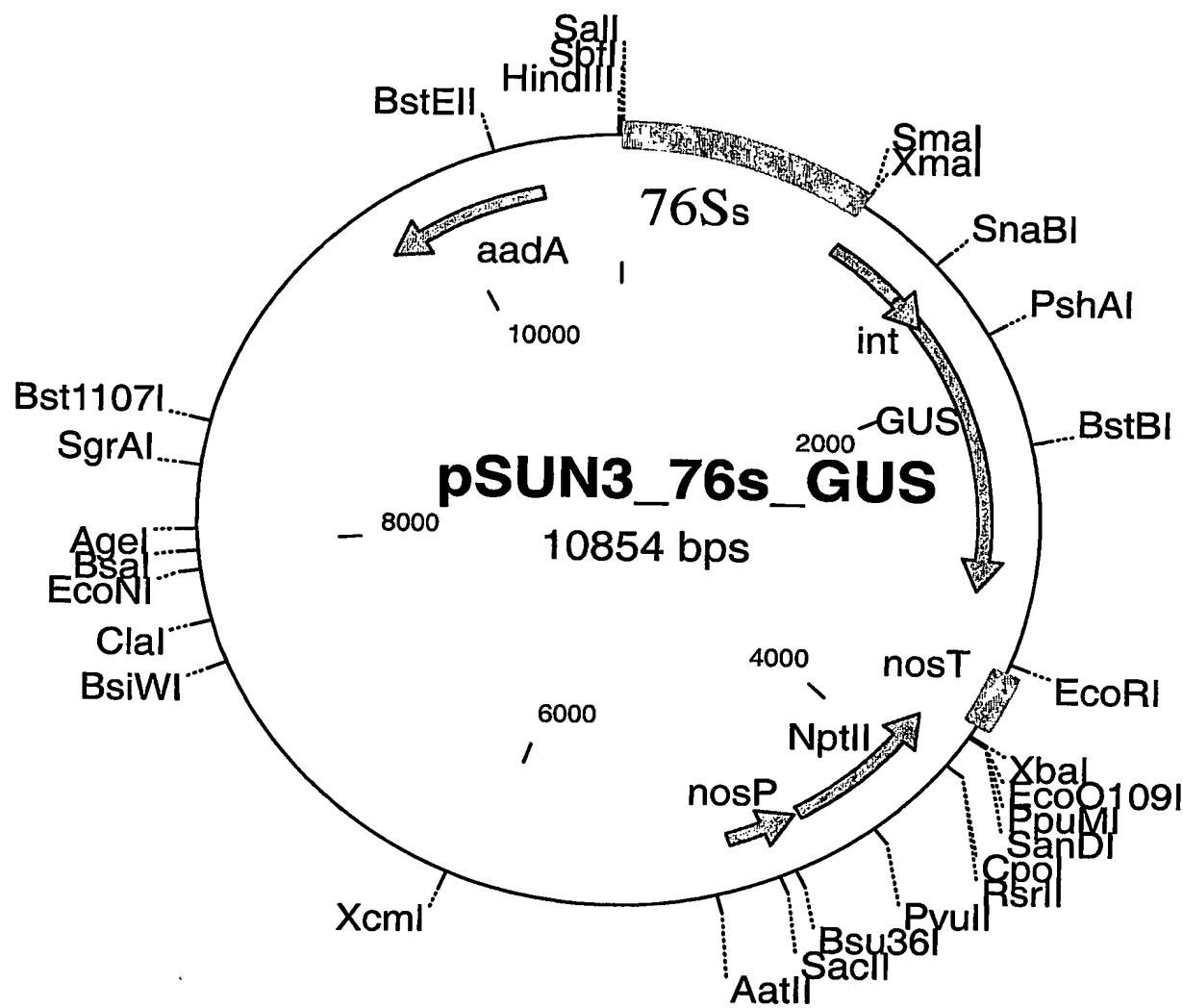


Fig. 4

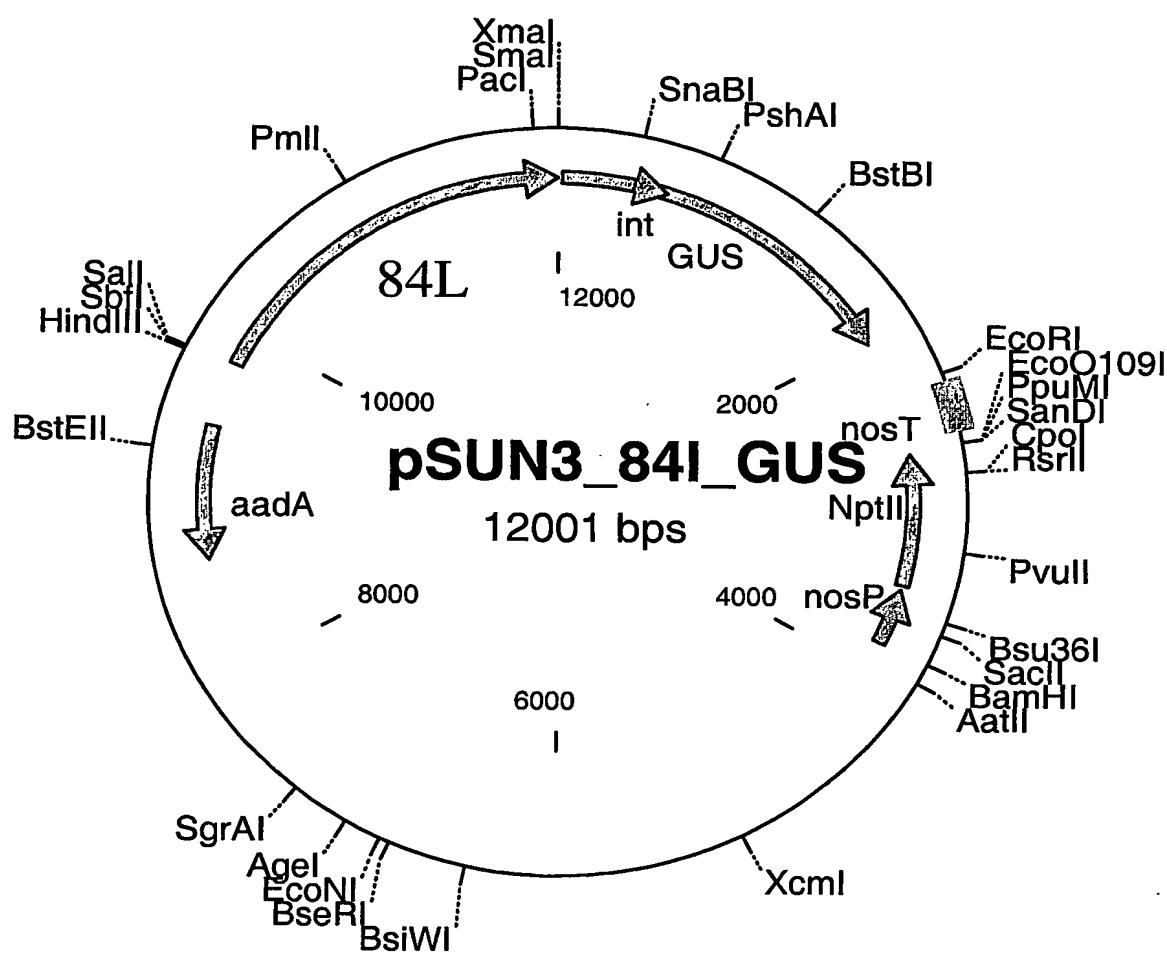


Fig. 5

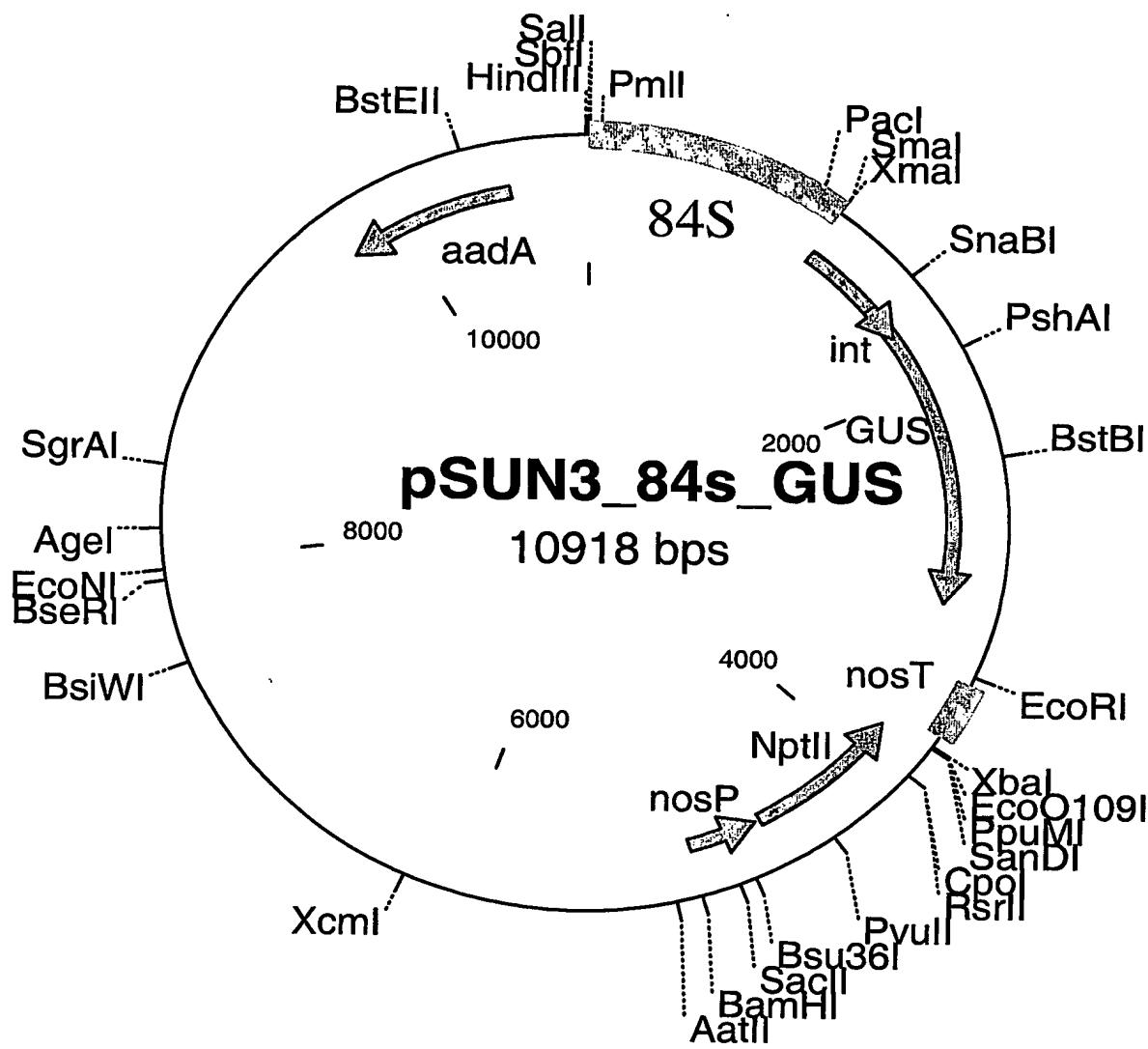


Fig. 6

75

At2g46720 (1) SCHQPTIDSCCKISSETFFENMAKGAQLYTDETIQFMTRILNRSGLGDDTYSPRCMLTSPPTPSMFEARHESELVIFG  
Brassica H1 (1) ---QPTDSCKKISSETFFENMAKGAQLYTEETIOTFMTRILNRSGLGDDTYAPRCMLTSPPTPSMFEARHEAEELVIFG  
Consensus (1) QPTDSCKKISSETFFENMAKGAQLYTDETIQFMTRILNRSGLGDDTYAPRCMLTSPPTPSMFEARHEAEELVIFG

149

At2g46720 (76) ALNSLFKKRTGIEPREVGIFTIVNCSSMIVNRYKLKTDVKTYNLSGMGCSAGAISVDLATNLJKA  
Brassica H1 (73) ALNSLFKKRTGIEPRDIGIFIVNCSSMIVNRYKLKTDVKTYNLSRMGCSAGAISVDLAAHL  
Consensus (76) ALNSLFKKRTGIEPRDIGIFIVNCSSMIVNRYKLKTDVKTYNLIS MGCSAGAISVDLA

76

Fig. 7

76

At3g01980 (1) NCFIKSYFGKMNPAKRVLMTSNGDEVSRNIAFLAKHGCKLVMMGNEGSLRSIVDKIRDSEGAFFPADVIALDME  
 Brassica H2 (1) -----NGDEVSRNIAIQLAKHGCRVLGMGNEASLRSTVDYIRVSVGDGFVVELIGADME  
 Brassica H3 (1) EFSSGRRFRTTLNIMANKVLMTDNGDQVSRSRNIAIQLAKHGCRVLGMGNEASLRSTVDYIRESDGAFVVELIGADME  
 Consensus (1) K F L A KVLMT NGDEVSRNIAIQLAKHGCRVLGMGNEASLRSTVDYIR SIDGAFVVELIGADME

152

At3g01980 (77) SDSEVAFHAAVQKAWELSGHEDAFLNNSTYQGKVQDILQSDETRITKINETAPWELLKAVATRMKDHGSGSI  
 Brassica H2 (55) ADSEEDFYYAVAVQKAWTRIGSLDAFVNCCCTYQGMODILRSEDEFKKITRINLTATWFILKAVASMMKENGTTGGSI  
 Brassica H3 (77) ADSEEDFYYAVAVQTAWTRIGSLDAFVNCCCTYQGKMQDILRSEDEFKKITRINLTATWFILKAVASMM-----  
 Consensus (77) ADSEEDFYYAVAVQKAWTRIGSLDAFVNCCCTYQGKMQDILRSEDEFKKITRINLTATWFILKAVASMMKD GS GGSI

Fig. 8

82

At1g63140	(1)	KYRTVETGDDNIGSRKTYERYAAEPVCTEFFLNRGDELGLGSSLATLENVWLGEGVCMKWPWEHLKDMILEGKDAFTSAHGMRFELIG
Brassica H4	(1)	--RRERGENNLTGKJQWYRAEPVCTEFFLKGHESSGSLMSLFMWHHSQVFEETWTHLKDLIQEGKDTFISAHGMRIEEYIG
Brassica H5	(1)	--AEPVCTEFFLTRGDDSGTHKSLEMJNSQVFEEKTWDLNLKGVIQEGKDAFSSAANGMPLIEFYIG
Consensus	(1)	GDN S K VYAAEPVCTIEL RGDDSGSSL SLEMVLNISQVEFKTWDHLKDLIQEGKDAFSSAANGMRFEEYIG

83

At1g63140	(83)	SNEQFAEMFNRAMSEASTLIMKKYLEVYKGFFEDVNTLVGGGGIGTLIGQVTSKYPIHKGINFDLAVLAHAPENKGVEHVS
Brassica H4	(80)	LNEQFACMFNHAMSSESTMIMKKILEVYRGFFEDIKTLVDIGGGGLGTTINLVTSKYPIHRY--FRNLN-----
Brassica H5	(62)	LDEQFAGMFNHAMAESSTIIMKKILEVYRGFFEDVNTLVGGGGLGTINLVTSKYPOIKGGINFDLTMVLANAPSYPGV
Consensus	(83)	LNEQFA MFNHAMSESTSITIMKKILEVYRGFFEDVNTLVGGGGLGTINLVTSKYPIHKGINFDL VIA AP GV

Fig. 9

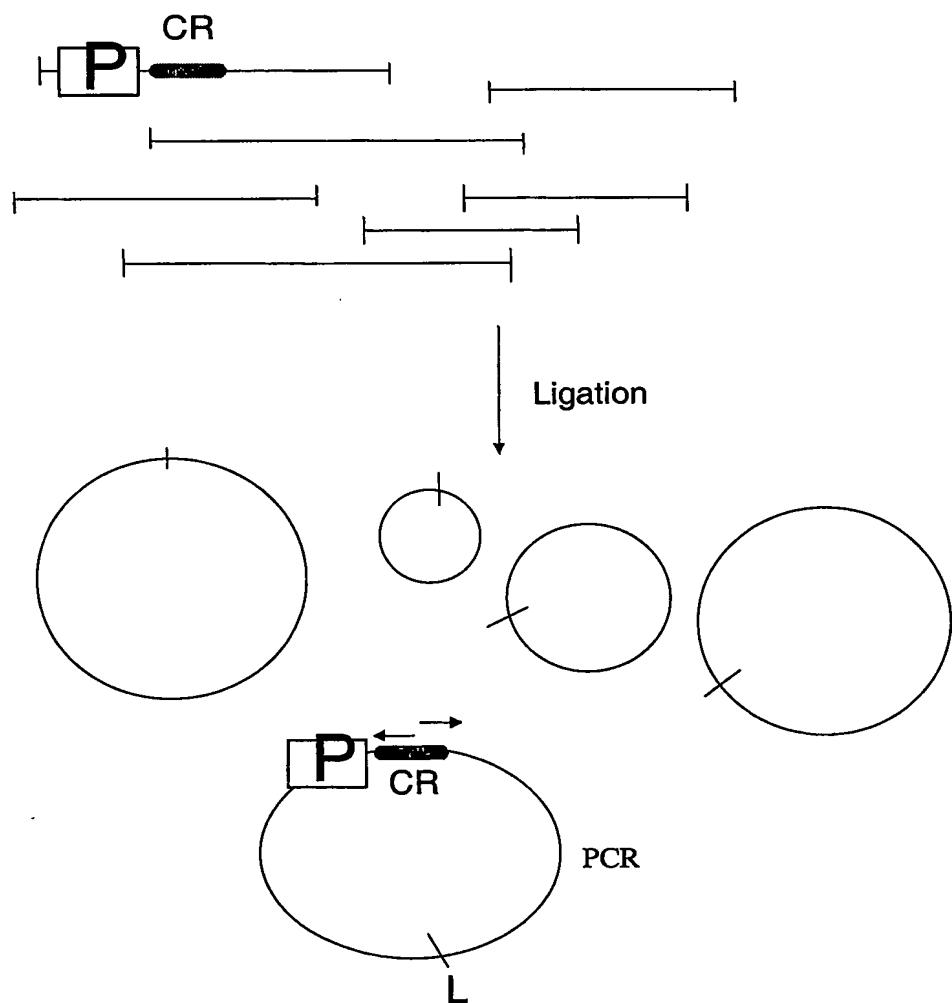


Fig. 10

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; SunGene GmbH &amp; Co.KGaA

<120> Transgene Expressionskassetten zur Expression von  
Nukleinsäuren in nicht-reproduktiven Blütengeweben von  
Pflanzen

&lt;130&gt; AE20020632

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 51

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1930

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; promoter

&lt;222&gt; (1)..(1930)

<223> 60L promoter (including 5'-untranslated region) of  
genelocus At2g46720

&lt;400&gt; 1

tatagagatg gcgttaagcg cgtttgcgc gggaaaaatg tggctcggt tttaaggta 60  
ccgttatta aaacacaaaa tcgttaccgc aagttgtaca aataggtgaa cgcacttta 120  
aaaaatggtc gtctttgt gactttatac gtataagaac acatgaatac gaccattta 180  
aacaaaaagag cataaaaata gttctgatca cgagttaaaa cttatctcaa ttcactgttt 240  
aaacatttta accattctaa ttgttaccat gtttattaca aaatatgtat accaatttatt 300  
tgtgttatga ttgttccca tgggtgcacc ggttgcacac tttcatagca ttaataaaatt 360  
aatttcgcat ggagtatttgc aatttgatatg gtctgtgaaa ctttgacac tttacctgaa 420  
agaagtgtgt tagaatcatg tgattttcct caaatttgatt tgttagtta attaatgaat 480  
ccaaaagagg aaagtagaaa agggaaaagga ctgcaggatct ctaaaagatag atagaattta 540  
ttacgggtca gtgttgggtt ggagattttc cagttcattt taaattgttag ttgaagtgg 600  
cagtggctgg ccaagttgga cgtggaccaa tgagaaacaa atatttgagac agtgtactcg 660  
tacgtttct gtgttagttt gaccattttt ttttattaaaa atacatataa agtcacaatt 720  
atttcgcagc cggatgtgt tgtatccaa gtctcatttac aattgacaaa attagatatg 780  
taaattaaatg ctatatacaa cgtagcttc tctaaaagaa acactaataa gccatgcatt 840  
ttcaccaaca gctaccatgc ttttggaaat ctatacgctc tatatgtttt accttatcat 900  
acatattcaa aacatcaaac gcagtttagta atatacggtt ttttggacaa aatcggttga 960  
agatgattag tgagtatatg gttcccagag attgaggtcg aagtagcatt ctccatgatc 1020  
tatctgcaaa tagtaaacca accaaactct ctagaaacta aacagaaata attcgagagt 1080  
agcaaattct aatcatacac gatcacatgt atctaccact atattttttt catatgcttc 1140  
gttcgtttcg ttggcatttgc attgtaccat tgtactttaa gaagcctata cttttacatt 1200  
ttcgacaaca ttgaccctttt gatttttaat ggttaattaaat cgagaaaatc tgaaccaaag 1260  
ttaatgtatt tccaaaaatc gtttagaaac cctctcaact taaactcaaa ctgggtatc 1320  
cagactattc gcatgacgtt caccactgc ccaacactaa ttattttggct ggatagcttgc 1380  
gtttgcttgc gccaagtgc tagaatcttag taatttttaa agatgtgtat gaatgttcta 1440  
gtattttctt gaaaaggaat atgaatataat tcactatgtt cagttacttc ttcacattat 1500  
attttacggt tacaatattt atatttagtt tagatctgtt caaagaattt tggtagcat 1560  
tcaacttagta aaatgtcatg aaaaacaaag aaataggaat ggttagtaaa cttAACGAAG 1620  
cttcacttta ttacactc aaatgttac agatttttaat gtaattctac ttcttctt 1680  
aataacaaag aaagtagaaat agtagatgac tgaatattaa ttatcatagg gtaaaggagc 1740  
tacgaatata ttcccttagta ttatttgcatt tcgttagttc aattttgaaa tgcctcttta 1800  
aatttgggaa gatgaatatac tctctctt tttaagtata atcttcaat ttttggact 1860  
tgttagctg gaaatcgctt tctaatttttgc ttcttattttg ttaaaaaactg ttgttagttg 1920  
taactgcctg 1930

<210> 2  
<211> 2039  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(2039)  
<223> 76L promoter (including 5'-untranslated region) of  
genelocus At3g01980

<400> 2

tatcctctgc gcaatgaatt caacaaacgt tttacacaaa gaaaaaaaaacc tgttgaaaat 60  
gaaagaaaaa aagtgtatgaa atacattaga aaccttttgg atatagtcaa ggacttgagt 120  
gtctctgatc ttattgccat cttggtcgtat gactttgaaa acgtccatga accaacctcc 180  
atcggaagag atgttaagctt tcttgatcac aagattcata tcagttagca cttgtactac 240  
ttccaataga gtccccatgtt tgttcacact atcaacccctt tatttagcac cacaacaaaa 300  
cagggaactc tggtttctca aaatctctt gtttgtaca gaaccactg aacaatttga 360  
agagacagat ttatttacct gaataacagt ggcatcgatc cttgcgttgt tgcattttac 420  
aactctgtat ccaccatgaa acatacataa ataaagatga atgttttagc agctgaaatc 480  
tttacaagggt tatagaggct cacaacggg gcatggagaa acagaggacc tagaaaaacaa 540  
taaaagagta tggagagaaa gagaaaaacc tggaggatt cattctcctg atgagcttgg 600  
catattcatc atcatccatg gttgttagtat gtatctcctt ggtgatttgg ctgcagcaga 660  
aacccagaag agtgtgatc ctccaaatttgc tgaggaaaat tcctaaaaga gagagggaga 720  
gggaagttga aggaggataa aatggtagg ccacccggAAC cgaacccctgt tttcatttagt 780  
tgatcgagca cgtgccacta aagattctt gagatgacgt ggcacccggca cagcaacttt 840  
tagattctgt tataattgtt cgaataactac caaaagtcgg gtgaagattt ggggtcaatt 900  
tgatgatcat aaaggggatt atattctcct tctcaagcaa gatgtgttat ttacttagat 960  
aatagatcat tcgttatctt gaggttagacc tctccgtAAC gttcacaggt gcatgaccaa 1020  
gtaacaattt gattccccc cagcataacg tcatgttggg tgcaaaaaaga aggcaaaatgt 1080  
gagcaagcaa gcaagcaaaag cattttctt attttatatt ttgttgcggg ttccaccacc 1140  
caactgaaaaa attgacatgt cacaatgatt tcgtatccta gtcttttatt atttaacact 1200  
ctcacaatcc cattactcta cacctcttc attaagtcaa cacacgggtt tcaaaaatcc 1260  
actaccctcc caccacctag aatctttgt tacctaccaa caccctcctt ttttctctt 1320  
atatattggt ccaactaaat caataaggaa aagcatcctt ttgttggag gaattgcttt 1380  
cattctact ctttgggtgt tgatcaatgg actagctaat aacaagttcc tcctctat 1440  
atttcaaaag aatggaaacag aaacataaac gaaagacaga gtacccgtat ttgttgcattc 1500  
attgtctgtc tggagctccc aatgcctt tatgttaca tattcataac caacaacccgc 1560  
tattaattat aaacaaaaaa cacgaaataa gtttggtagca aagtggaaatt aggaatctt 1620  
gagatggatc cattagtagt aggataatag gatatgtgg aattttgggtt gggAACAGTG 1680  
ataacttacg cttgcttccg gcgcggggaa agttggaaaaa cctacaaaatgt acagaaatgg 1740  
atctggccct tgaagtgggc tttttattaa agaaaaaaaat acatctccgt tatcaatcac 1800  
catcttcttc tatctacaaa ttaaagaagg taacaacaga acgtgggtt tcatgtgttt 1860  
aggcattaat tatttgcctt gtttgcgggt tttggtaaca cacagacaca gttccggtaa 1920  
gagctttgc agccactctt tatagttt tagaattggc gatcgaatca atctcactcc 1980  
ctccctccct taagtcttgc tgaatctgct gaattttttt ataaagagtt actttggca 2039

<210> 3  
<211> 2180  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana  
<220>  
<221> promoter  
<222> (1)..(2180)  
<223> 84L promoter (including 5'-untranslated region) of  
genelocus At1g63140

<400> 3

catgtttcag aggatatgtt cacaacaatt cccaaagcag atgcccattt catgaaatgt 60  
aactcatata tatttcatttcc atggaaaaatgt ttaatcaata acaaataacta tcttcatttc 120

ataaaaagcct tgtttcagat tttttcacac acatttaaaa gtgtttaag tttatcttat 180  
acctttaagt acatttatga tttttttttt ctcctattaa ataagctgaa agattataga 240  
taaatggttt tgtttatta aaaatgatgc attgaaaata taaaaggaca ttttataatat 300  
agatactaca tgatttaggcc gatggAACCA aagatgagcg actcttcttg taacattgtg 360  
tttgctacgc aatgctcggt ttttttttc tttagatcgag actttgcctg agattctgg 420  
tttcttcgat tgtgaaatca tatatgtctt gccttctcat ataggtcaa cattgaccaa 480  
caaaaaactac ggggggtta gtttttttg ggtggagagt ggagactaac ctgcaccc 540  
ttcatttgtat atgattttc tttcttgtat gaactattgt ttgttatttgcgctgtca 600  
tttgttccga gtgtttcgt atatgctta aacaagcacg tactatcagc aatagcaaaa 660  
gtaacatgat atttgttaat cccgttggaa attcatgtcc attatttgt atatataat 720  
attatataat agtagaattt ggttatgtat tgcattattct ctaaatctat gcttctaa 780  
gttaaaaaaca ggcgcCcata tggacgacat aaatgtcgat attaagagg cactgcaagt 840  
tgaacaaaaa aaaaaaagta taggcactgc aaaagttatc caacgtattt aagactaagg 900  
actaaagatt caaagataat attcagaaaa agaaaaaagaa aaaaagagaa gataatattc 960  
ggaaacatcc acaagcattc taaatctaga aaacataaat aatacagcaa agatggggat 1020  
gaagatatga tccaactcca tcacagattc tcaagacaga ttttagaaagt gtcagctca 1080  
ccaaaagggt tataggagac tgactgttaa ttgaaatgct ttctacacgt ggacgcactg 1140  
atatcatatt aaaacctgat tgtttgtat acattcacta actcatacca aacggtccaa 1200  
acctatgtct ccattttctt aaatgttgat ttgcatttca tacctacttt gcatacatta 1260  
ttgaatgtgt ttcttaagtt gtgattaaaa ttaatgagc acaatatcac agtcgaatgg 1320  
tatatcgatg taacactta ggattgaatc aatatgaaaa gttatacacc gaatttggta 1380  
gaaacgagta tagcttagac aaaatttggtt ttctttaaat taagcgaaaa aataattaaa 1440  
cagagaccaa attaagcggtt cttcttgaac tgaatcact aaagtaaagt taaccggta 1500  
gtagagtgtt aactattaa acaaagaaaa ctccaaaccc aattgagaaa ctactcaa 1560  
atagaaacaa cacataatga ttcatgtatc accaatatca tattcaactt ttttcgatt 1620  
cccttaaaac aaaatataat taaccaaata aaataggta taatcgattc agaaacaatt 1680  
tcatattctt ctctagtttta gttcagtttca attctaccgg agttgtatac aatctataat 1740  
tttatcgctt attaccttaa aagcgccctc aaaccaacca aaacaaaaat agttgcatca 1800  
atgaatccat caaagcatat aaattcacac cgtcttaaaa tggagtggtt atggataagt 1860  
accaacaatt ttagaccatt cacactgaat gagttgact aacattcaca ttcacatca 1920  
attagggaaag ttgtactaat gaacacacaa taaaagtga aacaatctc tacatattct 1980  
tgtacaccaa tctatattatc atgatcattt taaatataca cgaatattaa ttttataat 2040  
gaaaaatacg tgcccattt ttaatttataat tataatatttgcataatcatttatttgcata 2100  
atgttggtga ggttcttag tataaaaaat gacaaagtat gaataccatc tatacctta 2160  
ttacctatct ttctcgattt 2180

<210> 4  
<211> 1111

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1111)

<223> 60S promoter (including 5'-untranslated region) of  
genelocus At2g46720

<400> 4

tatagagatg gcgttaagcg cggttgcgc gggaaaaatg tggctcggt tttaaggta 60  
ccgttttataa aaacacaaaaa tcgttaccgc aagttgtaca aataggtgaa cgcactttt 120  
aaaaatggtc gtcttttgc gacttttatac gtataagaac acatgaatac gaccatttt 180  
aacaaaaagag cataaaaaata gttctgtatca cgagttaaaaa cttatctcaa ttcactgttt 240  
aaacatttttta accattctaa ttgttaccat gtttattaca aaatatgtat accaattatt 300  
tgtgttatga ttgttccca tgggtgcacc ggttgcacac ttcatagca ttaataattt 360  
aatttcgcat ggagtatttgc aattgtatgc gtctgtgaaa cttttgacac tttacctgaa 420  
agaagtgtgt tagaatcatg tgatttccct caaatttgatt tggtagtta attaatgaat 480  
ccaaaaagagg aaagttagaaa agggaaagga ctgcagatct ctaaagatag atagaattta 540  
ttacgggtca gtgttgggtt ggagatttgc cagttcattt taaattgtat ttgaagtgg 600  
cagtggctgg ccaagttgga cgtggaccaa tgagaaacaa atattgagac agtgtactcg 660

tacgtttctc gtgttagttg gaccatttaa tttattaaaa atacatataa agtcacaatt 720  
atttgcggc cggatgttgt ttttatccaaa gtctcattac aattgacaaa attagatatg 780  
taaattaaatg ctatatacaa cgtagcttc tctaaaagaa acactaataa gccatgcatt 840  
ttcaccaaca gctaccatgc ttttgaaaat ctatacgctc tatatgttta accttcat 900  
acatattcaa aacatcaaac gcagtttagta atatacggtt ttttggaca aatcggttga 960  
agatgattag tgagtatatg gttcccagag attgaggtcg aagtagcatt ctccatgatc 1020  
tatctgcaaa tagtaaacca accaaactct ctagaaacta aacagaaata attcgagagt 1080  
agcaaaattct aatcatacac gatcacatgt a 1111

<210> 5

<211> 1033

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1033)

<223> 76S promoter (including 5'-untranslated region) of  
genelocus At3g01980

<400> 5

agggtgcattga ccaagtaaca atttgattcc ttccagcat aacgtcatgt tggttgcaaa 60  
aagaaggcaa agtagagcaa gcaagcaagc aaagcatttt tcttattttt tatttttttg 120  
cggttccac caccacttg aaaaattgtac atgtcacaat gatttcgtat cctagtctt 180  
tattatttaa cactctcaca atcccattac tctacacctc ttccattaag tcaacacacg 240  
gtttcaaaa atccactacc ctccccaccac ctagaatctt ttgttaccta ccaacaccc 300  
cctttgttct ctttatatat tggccaact aaatcaataa gggaaagcat ccttttggtt 360  
ggaggaattg ctttcattct cactctttgt gtgttgcata atggactagc taataacaag 420  
ttccctctt atatattca aaagaatgga acagaaacat aaacgaaaga cagagtacct 480  
gatgttgatg attcattgtc tgcgtggagc tcccaaattgc cttttatgct tacatattca 540  
taaccaacaa cggctattaa ttataaacca aaaacacgaa ataagttgt agcaaagtga 600  
aatttaggaat ctggagatg gatccattag tagtaggata ataggatatg atggaaattg 660  
gttggggaaac agtgataact tacgcttgct tccggcgccg ggaaagttgg aaaacctaca 720  
aagtacagaa atggatctgg gccttgaagt gggctttta ttaaagaaaa aaatacatct 780  
ccgttatcaa tcaccatctt cttctatcta caaattaaag aaggtaccaa cagaacgtgg 840  
tggatcatgt ggttaggcat taattatttg ctgttttcg ccgttttgtt aacacacaga 900  
cacagttccg gtaagagctt ttgcagccac tctttatagt tattnaaat tggcgatcga 960  
atcaatctca ctccctccct cccttaagtc ttgttgaatc tgctgaattt ttttataaag 1020  
agttactttg gca 1033

<210> 6

<211> 1097

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(1097)

<223> 84S promoter (including 5'-untranslated region) of  
genelocus At1g63140

<400> 6

aaagggttat aggagactga ctgttaattt aatgttttacacgttga cgcaactgata 60  
tcatattaaa acctgattgt ttgttgaaca ttcaactt cataccaaac ggtccaaacc 120  
tatgtctcca ttttcttaaa tttgttatttc gattccatac ctactttgca tacattattt 180  
aatgttttc ttaagttgtt attaaaattt aatgagcaca atatcacagt cgaatggat 240  
atcgatgtaa cacttttagga ttgaatcaat ataaaaagtt atacacccaa tttgtgagaa 300  
acgagtatag cttagacaaa attgtttttt cttaaattaa gcgaaaaat aattaaacag 360  
agaccaaatt aagcgttctt cttgaactga aatcactaaa gtaaagttaa cccgttagta 420  
gagtgttaac tatttaaaca aagaaaactc caaacccaaat tgagaaaacta ctcacaaatata 480  
gaaacaacac ataatgattc agtagctacc aatatcatat tcaactttgtt ttcgattcct 540

ttaaaaacaaa atataaattaa ccaaataaaaa taggtcataa tcgattcaga aacaatttca 600  
tattttctc tagtttagtt cagtttcatt ctaccggagt tgtatacat ctataatttt 660  
atcgcttatt accttaaaaag cgtcctcaaa ccaaccaaaaa caaaaatagt tgcataatg 720  
aatccatcaa agcatataaa ttcacaccgt cttaaaaatgg agtgttgatg gataagtacc 780  
aacaatttta gaccattcac actgaatgag tatgactaac attcacattc acattcaatt 840  
aggaaaagttg tactaatgaa cacacaataa aagtaaaaac aaatctctac atattcttgt 900  
acaccaatct atatttagatg atcattttaa atatacacga atattaattt tataaatgaa 960  
aaatacgtgc ccataattta attaatttat atatttagct atcaaataattt aggataatg 1020  
ttggtgaggt ttctgagttt aaaaaatgac aaagtatgaa taccatctat acctttattta 1080  
cctatcttc tcgattt 1097

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer

<400> 7

cccggtata gagatggcgt taagc

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer

<400> 8

gtcgactaca tgtgatcgtg tatga

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer

<400> 9

gtcgaccagg cagttacaac ttaca

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer

<400> 10

cccggtgcc aaagtaactc tttat

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer

<400> 11  
gtcgacaggt gcatgaccaa gtaac 25  
<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer  
<400> 12  
gtcgactatc ctctgcgcaa tgaat 25  
<210> 13  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer  
<400> 13  
cccgggaaat cgagaaaagat aggta 25  
<210> 14  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer  
<400> 14  
gtcgacaaag ggttataggg gactg 25  
<210> 15  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Oligonucleotide primer  
<400> 15  
gtcgaccatg ttccagagga tatgt 25  
<210> 16  
<211> 1401  
<212> DNA  
<213> Arabidopsis thaliana  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1389)  
<223> coding for transcript (cDNA) of gene locus  
At2g46720  
<400> 16  
atg ttc att gca atg gca gat ttc aaa att ctt ttg ctt ata ctc atc 48  
Met Phe Ile Ala Met Ala Asp Phe Lys Ile Leu Leu Leu Ile Leu Ile  
1 5 10 15

ctt ata tct ctc ttt gaa ctt gat cta ctt cat ttt cac cat gac ttc Leu Ile Ser Leu Phe Glu Leu Asp Leu Leu His Phe His His Asp Phe	20	25	30	96
ttc tct cct ttt ccg gtc aag atc ggt tta ctc ctg ata tcc atc ttc Phe Ser Pro Phe Pro Val Lys Ile Gly Leu Leu Leu Ile Ser Ile Phe	35	40	45	144
ttc tat gcc tac tca acc acc cggt tct aaa ccg gtt tac cta gtg gat Phe Tyr Ala Tyr Ser Thr Arg Ser Lys Pro Val Tyr Leu Val Asp	50	55	60	192
ttc tca tgt cac caa ccc acg gat tct tgc aaa atc tca tcc gaa acg Phe Ser Cys His Gln Pro Thr Asp Ser Cys Lys Ile Ser Ser Glu Thr	65	70	75	240
ttc ttc aac atg gcc aaa ggc gct caa ctc tac acc gat gaa aca atc Phe Phe Asn Met Ala Lys Gly Ala Gln Leu Tyr Thr Asp Glu Thr Ile	85	90	95	288
caa ttc atg acg agg ata tta aac ccg tcc ggt tta gga gac gat acg Gln Phe Met Thr Arg Ile Leu Asn Arg Ser Gly Leu Gly Asp Asp Thr	100	105	110	336
tac tcc cca cgt tgc atg tta acc tct cca cca act cca tca atg tac Tyr Ser Pro Arg Cys Met Leu Thr Ser Pro Pro Thr Pro Ser Met Tyr	115	120	125	384
gag gcg aga cat gaa tcc gaa tta gtt atc ttc gga gct ctt aac tca Glu Ala Arg His Glu Ser Glu Leu Val Ile Phe Gly Ala Leu Asn Ser	130	135	140	432
cta ttc aag aaa acc gga atc gaa ccg aga gaa gtc gga atc ttc att Leu Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Pro Arg Glu Val Gly Ile Phe Ile	145	150	155	480
gta aac tgc agc ttg ttt aac cct aac cca tct ctc tcg tcc atg atc Val Asn Cys Ser Leu Phe Asn Pro Asn Pro Ser Leu Ser Ser Met Ile	165	170	175	528
gta aac ccg tac aag ctt aaa acc gac gtc aaa act tac aat ctc tcc Val Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Thr Asp Val Lys Thr Tyr Asn Leu Ser	180	185	190	576
ggg atg gga tgc agc gcc ggc gca atc tcc gtc gac ctc gcc aca aat Gly Met Gly Cys Ser Ala Gly Ala Ile Ser Val Asp Leu Ala Thr Asn	195	200	205	624
cta cta aag gca aac cct aat acc tac gca gtt att gtt agt acg gag Leu Leu Lys Ala Asn Pro Asn Thr Tyr Ala Val Ile Val Ser Thr Glu	210	215	220	672
aac atg acc cta agc atg tat cga ggc aac gac ccg tca atg tta gtc Asn Met Thr Leu Ser Met Tyr Arg Gly Asn Asp Arg Ser Met Leu Val	225	230	235	720
cct aac tgt cta ttc cga gta ggt ggc gct gcg gtt atg ctc tca aac Pro Asn Cys Leu Phe Arg Val Gly Gly Ala Ala Val Met Leu Ser Asn	245	250	255	768
cgg agt caa gac cga gtc ccg tct aag tac gaa ttg act cat att gta Arg Ser Gln Asp Arg Val Arg Ser Lys Tyr Glu Leu Thr His Ile Val	260	265	270	816
agg act cac aaa ggc tct agc gat aaa cac tac act tgt gct gaa caa Arg Thr His Lys Gly Ser Ser Asp Lys His Tyr Thr Cys Ala Glu Gln	275	280	285	864

aaa gaa gat agt aaa ggt atc gtt gga gtc gca ctc tct aaa gaa cta	912
Lys Glu Asp Ser Lys Gly Ile Val Gly Val Ala Leu Ser Lys Glu Leu	
290 295 300	
acg gtt gtt gct ggt gac tcg tta aag acg aat cta aca gca ctt ggt	960
Thr Val Val Ala Gly Asp Ser Leu Lys Thr Asn Leu Thr Ala Leu Gly	
305 310 315 320	
ccg ctt gtg ttg cct tta tct gaa aaa ctc cgg ttt atc ctc ttt ttg	1008
Pro Leu Val Leu Pro Leu Ser Glu Lys Leu Arg Phe Ile Leu Phe Leu	
325 330 335	
gta aag agt aag ctt ttc cgg tta aag gtt agt cca tat gtt ccg gat	1056
Val Lys Ser Lys Leu Phe Arg Leu Lys Val Ser Pro Tyr Val Pro Asp	
340 345 350	
ttt aaa cta tgt ttc aag cat ttc tgt att cac gct ggt ggt aga gcg	1104
Phe Lys Leu Cys Phe Lys His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala	
355 360 365	
tta ctt gac gcg gtt gaa aaa ggt ctt gga ctt agt gag ttt gat ctt	1152
Leu Leu Asp Ala Val Glu Lys Gly Leu Gly Leu Ser Glu Phe Asp Leu	
370 375 380	
gag ccg tct cgg atg act ttg cac cgc ttt gga aac act tca agc tcg	1200
Glu Pro Ser Arg Met Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser	
385 390 395 400	
tcg ctg tgg tac gag ctg gct tac gtg gag gct aaa tgt cgg gtc aaa	1248
Ser Leu Trp Tyr Glu Leu Ala Tyr Val Glu Ala Lys Cys Arg Val Lys	
405 410 415	
cga gga gat agg gtt tgg cag ttg gcg ttt ggg tcg ggt ttt aaa tgt	1296
Arg Gly Asp Arg Val Trp Gln Leu Ala Phe Gly Ser Gly Phe Lys Cys	
420 425 430	
aat agt att gtg tgg aga gcg ttg aga acg att ccg gct aac gag tca	1344
Asn Ser Ile Val Trp Arg Ala Leu Arg Thr Ile Pro Ala Asn Glu Ser	
435 440 445	
ttg gtg ggt aac ccg tgg ggt gac tcg gtt cat aag tat cca gtt	1389
Leu Val Gly Asn Pro Trp Gly Asp Ser Val His Lys Tyr Pro Val	
450 455 460	
cacgtgaccc aa	1401
<210> 17	
<211> 463	
<212> PRT	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 17	
Met Phe Ile Ala Met Ala Asp Phe Lys Ile Leu Leu Leu Ile Leu Ile	
1 5 10 15	
Leu Ile Ser Leu Phe Glu Leu Asp Leu Leu His Phe His His Asp Phe	
20 25 30	
Phe Ser Pro Phe Pro Val Lys Ile Gly Leu Leu Leu Ile Ser Ile Phe	
35 40 45	
Phe Tyr Ala Tyr Ser Thr Thr Arg Ser Lys Pro Val Tyr Leu Val Asp	
50 55 60	
Phe Ser Cys His Gln Pro Thr Asp Ser Cys Lys Ile Ser Ser Glu Thr	
65 70 75 80	
Phe Phe Asn Met Ala Lys Gly Ala Gln Leu Tyr Thr Asp Glu Thr Ile	
85 90 95	

Gln Phe Met Thr Arg Ile Leu Asn Arg Ser Gly Leu Gly Asp Asp Thr  
100 105 110  
Tyr Ser Pro Arg Cys Met Leu Thr Ser Pro Pro Thr Pro Ser Met Tyr  
115 120 125  
Glu Ala Arg His Glu Ser Glu Leu Val Ile Phe Gly Ala Leu Asn Ser  
130 135 140  
Leu Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Pro Arg Glu Val Gly Ile Phe Ile  
145 150 155 160  
Val Asn Cys Ser Leu Phe Asn Pro Asn Pro Ser Leu Ser Ser Met Ile  
165 170 175  
Val Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Thr Asp Val Lys Thr Tyr Asn Leu Ser  
180 185 190  
Gly Met Gly Cys Ser Ala Gly Ala Ile Ser Val Asp Leu Ala Thr Asn  
195 200 205  
Leu Leu Lys Ala Asn Pro Asn Thr Tyr Ala Val Ile Val Ser Thr Glu  
210 215 220  
Asn Met Thr Leu Ser Met Tyr Arg Gly Asn Asp Arg Ser Met Leu Val  
225 230 235 240  
Pro Asn Cys Leu Phe Arg Val Gly Gly Ala Ala Val Met Leu Ser Asn  
245 250 255  
Arg Ser Gln Asp Arg Val Arg Ser Lys Tyr Glu Leu Thr His Ile Val  
260 265 270  
Arg Thr His Lys Gly Ser Ser Asp Lys His Tyr Thr Cys Ala Glu Gln  
275 280 285  
Lys Glu Asp Ser Lys Gly Ile Val Gly Val Ala Leu Ser Lys Glu Leu  
290 295 300  
Thr Val Val Ala Gly Asp Ser Leu Lys Thr Asn Leu Thr Ala Leu Gly  
305 310 315 320  
Pro Leu Val Leu Pro Leu Ser Glu Lys Leu Arg Phe Ile Leu Phe Leu  
325 330 335  
Val Lys Ser Lys Leu Phe Arg Leu Lys Val Ser Pro Tyr Val Pro Asp  
340 345 350  
Phe Lys Leu Cys Phe Lys His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala  
355 360 365  
Leu Leu Asp Ala Val Glu Lys Gly Leu Gly Leu Ser Glu Phe Asp Leu  
370 375 380  
Glu Pro Ser Arg Met Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser  
385 390 395 400  
Ser Leu Trp Tyr Glu Leu Ala Tyr Val Glu Ala Lys Cys Arg Val Lys  
405 410 415  
Arg Gly Asp Arg Val Trp Gln Leu Ala Phe Gly Ser Gly Phe Lys Cys  
420 425 430  
Asn Ser Ile Val Trp Arg Ala Leu Arg Thr Ile Pro Ala Asn Glu Ser  
435 440 445  
Leu Val Gly Asn Pro Trp Gly Asp Ser Val His Lys Tyr Pro Val  
450 455 460

<210> 18  
 <211> 1187  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (132)..(764)  
 <223> coding for gene product of Arabidopsis thaliana  
 gene locus At3g01980  
 <400> 18  
 gttccggtaa gagctttgc agccactctt tatagttatt tagaattggc gatcgaatca 60  
 atctcactcc ctcctccct taagtcttgt tgaatctgct gaattgtttt ataaagagtt 120  
 actttggcaa a atg gaa aat ccg gcg aag aga gtg ttg atg aca tcc aac 170  
     Met Glu Asn Pro Ala Lys Arg Val Leu Met Thr Ser Asn  
     1              5              10  
 ggc gac gag gtg tcc cga aac atc gct ttc cat cta gcc aaa cac ggt 218  
   Gly Asp Glu Val Ser Arg Asn Ile Ala Phe His Leu Ala Lys His Gly  
   15              20              25  
 tgc aag ttg gta atg atg gga aat gag ggt tcc cta agg agc att gta 266  
   Cys Lys Leu Val Met Met Gly Asn Glu Gly Ser Leu Arg Ser Ile Val  
   30              35              40              45  
 gac aag att aga gat tcc att gag gga gcc ttc cct gcc gat gtt ata 314  
   Asp Lys Ile Arg Asp Ser Ile Glu Gly Ala Phe Pro Ala Asp Val Ile  
   50              55              60  
 gca ctc gac atg gaa tct gac tct gaa gtt gct ttt cat gcc gct gtc 362  
   Ala Leu Asp Met Glu Ser Asp Ser Glu Val Ala Phe His Ala Ala Val  
   65              70              75  
 caa aag gca tgg gaa ctt tcc ggc cat ttc gat gct ttt ctc aac tct 410  
   Gln Lys Ala Trp Glu Leu Ser Gly His Phe Asp Ala Phe Leu Asn Ser  
   80              85              90  
 tat acc tac caa ggt tta att tgc ttc ttg ttt ttc act acc ctg cct 458  
   Tyr Thr Tyr Gln Gly Leu Ile Cys Phe Leu Phe Phe Thr Thr Leu Pro  
   95              100            105  
 ttg atg ctc ttg tgt gtt gat cat tcc ttt att caa caa tct ttc ttt 506  
   Leu Met Leu Leu Cys Val Asp His Ser Phe Ile Gln Gln Ser Phe Phe  
   110            115            120            125  
 ctt gca gga aag gtg cag gac att ctt caa gtc tct caa gat gag ttc 554  
   Leu Ala Gly Lys Val Gln Asp Ile Leu Gln Val Ser Gln Asp Glu Phe  
   130            135            140  
 cac aga atc aca aag atc aat ctc acc gct cca tgg ttt ctc ttg aag 602  
   His Arg Ile Thr Lys Ile Asn Leu Thr Ala Pro Trp Phe Leu Leu Lys  
   145            150            155  
 gct gta gcc aca agg atg aag gac cat gga tca gga ggc tcc att gtc 650  
   Ala Val Ala Thr Arg Met Lys Asp His Gly Ser Gly Gly Ser Ile Val  
   160            165            170  
 ttc atg gcc act atc gcc agc gga gag agg gcg ctt tac cct ggc gct 698  
   Phe Met Ala Thr Ile Ala Ser Gly Glu Arg Ala Leu Tyr Pro Gly Ala  
   175            180            185  
 gat gcc tac gct tca act tct gcc gct att cac cag ctc gtc cggtt gta 746  
   Asp Ala Tyr Ala Ser Thr Ser Ala Ala Ile His Gln Leu Val Arg Val  
   190            195            200            205

11

tgc atc cta gct cct aat tagacacatc gcgttcgtaa cttgaatatg 794  
Cys Ile Leu Ala Pro Asn  
210

tttggatg attgggttc aggcatcagc catgagtctc gggaaagcaca agatacgggt 854  
caacatgatc tctagaggc tcgtatctgaa tgatgagtat acagcttctg tggaaagaga 914  
ccgagcgcag aagctggtca aggacgctgc acccctcgac cagtggctca acccggacac 974  
agacctctac tccactgtta tctacttgat cagcgatggc tcacgcttca tgacaggcac 1034  
cactgtcttg gtggatggag cgcaagtccct tacgcgaccc cgtctcaaatt cctacatgtg 1094  
atcaatgcct agtattatta taattctatg ttgtgtgtaa aaagtgaata tgaatcaagt 1154  
ttgaataact atggagggat gaataatcca tcc 1187

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 211

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 19

Met Glu Asn Pro Ala Lys Arg Val Leu Met Thr Ser Asn Gly Asp Glu  
1 5 10 15

Val Ser Arg Asn Ile Ala Phe His Leu Ala Lys His Gly Cys Lys Leu  
20 25 30

Val Met Met Gly Asn Glu Gly Ser Leu Arg Ser Ile Val Asp Lys Ile  
35 40 45

Arg Asp Ser Ile Glu Gly Ala Phe Pro Ala Asp Val Ile Ala Leu Asp  
50 55 60

Met Glu Ser Asp Ser Glu Val Ala Phe His Ala Ala Val Gln Lys Ala  
65 70 75 80

Trp Glu Leu Ser Gly His Phe Asp Ala Phe Leu Asn Ser Tyr Thr Tyr  
85 90 95

Gln Gly Leu Ile Cys Phe Leu Phe Phe Thr Thr Leu Pro Leu Met Leu  
100 105 110

Leu Cys Val Asp His Ser Phe Ile Gln Gln Ser Phe Phe Leu Ala Gly  
115 120 125

Lys Val Gln Asp Ile Leu Gln Val Ser Gln Asp Glu Phe His Arg Ile  
130 135 140

Thr Lys Ile Asn Leu Thr Ala Pro Trp Phe Leu Leu Lys Ala Val Ala  
145 150 155 160

Thr Arg Met Lys Asp His Gly Ser Gly Ser Ile Val Phe Met Ala  
165 170 175

Thr Ile Ala Ser Gly Glu Arg Ala Leu Tyr Pro Gly Ala Asp Ala Tyr  
180 185 190

Ala Ser Thr Ser Ala Ala Ile His Gln Leu Val Arg Val Cys Ile Leu  
195 200 205

Ala Pro Asn  
210

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 1146

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1143)  
<223> coding for transcript (cDNA) of gene locus  
At1g63140

<400> 20		
atg gag aac cat ctt caa cat tcc tta acc atc att cct aaa ccg gat		48
Met Glu Asn His Leu Gln His Ser Leu Thr Ile Ile Pro Lys Pro Asp		
1 5 10 15		
cta atc aaa gaa gaa caa cgt tat cac gaa gat acg gtg agc ttg caa		96
Leu Ile Lys Glu Glu Gln Arg Tyr His Glu Asp Thr Val Ser Leu Gln		
20 25 30		
gcg gag agg att ttg cat gcc atg acc ttc ccc atg gtt ctc aaa act		144
Ala Glu Arg Ile Leu His Ala Met Thr Phe Pro Met Val Leu Lys Thr		
35 40 45		
gct ttg gag ctt ggc gtt atc gac atg atc act tct gta gat gac ggc		192
Ala Leu Glu Leu Gly Val Ile Asp Met Ile Thr Ser Val Asp Asp Gly		
50 55 60		
gtg tgg ctc tcg cct tct gag atc gct ctt ggt ctc cca acc aag ccc		240
Val Trp Leu Ser Pro Ser Glu Ile Ala Leu Gly Leu Pro Thr Lys Pro		
65 70 75 80		
acc aat ccg gag gca cca gta ttg ctg gac cgg atg cta gtt ttg tta		288
Thr Asn Pro Glu Ala Pro Val Leu Leu Asp Arg Met Leu Val Leu Leu		
85 90 95		
gcc agc cac tca atc ttg aag tac cgt acg gta gaa acc gga gat aac		336
Ala Ser His Ser Ile Leu Lys Tyr Arg Thr Val Glu Thr Gly Asp Asn		
100 105 110		
att gga agt aga aag acc gag agg gtc tat gca gct gaa ccg gtt tgc		384
Ile Gly Ser Arg Lys Thr Glu Arg Val Tyr Ala Ala Glu Pro Val Cys		
115 120 125		
acg ttt ttc ttg aac cgc gga gat ggc ttg ggc tct ctc gcc act ttg		432
Thr Phe Phe Leu Asn Arg Gly Asp Gly Leu Gly Ser Leu Ala Thr Leu		
130 135 140		
ttc atg gta ctc caa ggg gaa gtc tgt atg aag cct tgg gaa cat ctc		480
Phe Met Val Leu Gln Gly Glu Val Cys Met Lys Pro Trp Glu His Leu		
145 150 155 160		
aaa gac atg ata tta gaa gga aaa gat gca ttc acc tct gct cat ggc		528
Lys Asp Met Ile Leu Glu Gly Lys Asp Ala Phe Thr Ser Ala His Gly		
165 170 175		
atg agg ttt ttc gaa ctc att ggt tcg aac gaa caa ttc gct gaa atg		576
Met Arg Phe Phe Glu Leu Ile Gly Ser Asn Glu Gln Phe Ala Glu Met		
180 185 190		
ttt aac cgg gca atg tcg gaa gct tcc aca ttg att atg aag aag gtt		624
Phe Asn Arg Ala Met Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ile Met Lys Lys Val		
195 200 205		
tta gaa gtt tac aaa gga ttc gaa gat gta aat act ttg gtg gat gtg		672
Leu Glu Val Tyr Lys Gly Phe Glu Asp Val Asn Thr Leu Val Asp Val		
210 215 220		
gga gga gga att gga aca atc ata ggt caa gtg act tcc aag tat cct		720
Gly Gly Gly Ile Gly Thr Ile Ile Gly Gln Val Thr Ser Lys Tyr Pro		
225 230 235 240		

13

cat att aaa ggc atc aat ttc gat cta gca tcg gtt tta gcc cat gct		768	
His Ile Lys Gly Ile Asn Phe Asp Leu Ala Ser Val Leu Ala His Ala			
245	250	255	
cct ttt aat aaa gga gtg gag cat gtt tca gga gat atg ttt aaa gaa		816	
Pro Phe Asn Lys Gly Val Glu His Val Ser Gly Asp Met Phe Lys Glu			
260	265	270	
att cca aaa gga gat gcc atc ttc atg aaa tgg ata cta cat gat tgg		864	
Ile Pro Lys Gly Asp Ala Ile Phe Met Lys Trp Ile Leu His Asp Trp			
275	280	285	
act gac gaa gat tgt gta aag atc cta aaa aat tat tgg aaa agt ctt		912	
Thr Asp Glu Asp Cys Val Lys Ile Leu Lys Asn Tyr Trp Lys Ser Leu			
290	295	300	
ccc gag aaa gga aaa gtg ata ata gtc gag gtg gtt acg ccc gag gaa		960	
Pro Glu Lys Gly Lys Val Ile Ile Val Glu Val Val Thr Pro Glu Glu			
305	310	315	320
cca aag att aac gac att tct tct aac att gtg ttc ggt atg gac atg		1008	
Pro Lys Ile Asn Asp Ile Ser Ser Asn Ile Val Phe Gly Met Asp Met			
325	330	335	
ctg atg tta gca gta agc tca ggt ggt aag gag agg tct ctt tcc caa		1056	
Leu Met Leu Ala Val Ser Ser Gly Gly Lys Glu Arg Ser Leu Ser Gln			
340	345	350	
tgc gag act cta gcc tct gat tcg ggt ttt ctt cgt tgt gaa atc att		1104	
Phe Glu Thr Leu Ala Ser Asp Ser Gly Phe Leu Arg Cys Glu Ile Ile			
355	360	365	
tgt cat gcc ttc tca tat agt gtt atc gaa tta cac aaa tag		1146	
Cys His Ala Phe Ser Tyr Ser Val Ile Glu Leu His Lys			
370	375	380	
<210> 21			
<211> 381			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 21			
Met Glu Asn His Leu Gln His Ser Leu Thr Ile Ile Pro Lys Pro Asp			
1	5	10	15
Leu Ile Lys Glu Glu Gln Arg Tyr His Glu Asp Thr Val Ser Leu Gln			
20	25	30	
Ala Glu Arg Ile Leu His Ala Met Thr Phe Pro Met Val Leu Lys Thr			
35	40	45	
Ala Leu Glu Leu Gly Val Ile Asp Met Ile Thr Ser Val Asp Asp Gly			
50	55	60	
Val Trp Leu Ser Pro Ser Glu Ile Ala Leu Gly Leu Pro Thr Lys Pro			
65	70	75	80
Thr Asn Pro Glu Ala Pro Val Leu Leu Asp Arg Met Leu Val Leu Leu			
85	90	95	
Ala Ser His Ser Ile Leu Lys Tyr Arg Thr Val Glu Thr Gly Asp Asn			
100	105	110	
Ile Gly Ser Arg Lys Thr Glu Arg Val Tyr Ala Ala Glu Pro Val Cys			
115	120	125	
Thr Phe Phe Leu Asn Arg Gly Asp Gly Leu Gly Ser Leu Ala Thr Leu			
130	135	140	

14

Phe Met Val Leu Gln Gly Glu Val Cys Met Lys Pro Trp Glu His Leu  
 145 150 155 160

Lys Asp Met Ile Leu Glu Gly Lys Asp Ala Phe Thr Ser Ala His Gly  
 165 170 175

Met Arg Phe Phe Glu Leu Ile Gly Ser Asn Glu Gln Phe Ala Glu Met  
 180 185 190

Phe Asn Arg Ala Met Ser Glu Ala Ser Thr Leu Ile Met Lys Lys Val  
 195 200 205

Leu Glu Val Tyr Lys Gly Phe Glu Asp Val Asn Thr Leu Val Asp Val  
 210 215 220

Gly Gly Gly Ile Gly Thr Ile Ile Gly Gln Val Thr Ser Lys Tyr Pro  
 225 230 235 240

His Ile Lys Gly Ile Asn Phe Asp Leu Ala Ser Val Leu Ala His Ala  
 245 250 255

Pro Phe Asn Lys Gly Val Glu His Val Ser Gly Asp Met Phe Lys Glu  
 260 265 270

Ile Pro Lys Gly Asp Ala Ile Phe Met Lys Trp Ile Leu His Asp Trp  
 275 280 285

Thr Asp Glu Asp Cys Val Lys Ile Leu Lys Asn Tyr Trp Lys Ser Leu  
 290 295 300

Pro Glu Lys Gly Lys Val Ile Ile Val Glu Val Val Thr Pro Glu Glu  
 305 310 315 320

Pro Lys Ile Asn Asp Ile Ser Ser Asn Ile Val Phe Gly Met Asp Met  
 325 330 335

Leu Met Leu Ala Val Ser Ser Gly Gly Lys Glu Arg Ser Leu Ser Gln  
 340 345 350

Phe Glu Thr Leu Ala Ser Asp Ser Gly Phe Leu Arg Cys Glu Ile Ile  
 355 360 365

Cys His Ala Phe Ser Tyr Ser Val Ile Glu Leu His Lys  
 370 375 380

<210> 22  
 <211> 424  
 <212> DNA  
 <213> Brassica napus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(423)  
 <223> coding for Brassica homologue H1

<400> 22

caa ccc acc gac tca tgc aaa atc tca tcc gaa acg ttt ttc aac atg	48
Gln Pro Thr Asp Ser Cys Lys Ile Ser Ser Glu Thr Phe Phe Asn Met	
1 5 10 15	

gcc aaa ggt gct caa ctc tac acc gaa gaa aca atc caa ttc atg acg  
 Ala Lys Gly Ala Gln Leu Tyr Thr Glu Glu Thr Ile Gln Phe Met Thr  
 20 25 30

96

agg ata cta aac cgg tcc ggt tta gga gat gat acg tac gcc cca cgt  
 Arg Ile Leu Asn Arg Ser Gly Leu Gly Asp Asp Thr Tyr Ala Pro Arg  
 35 40 45

144

15

tgc atg ttg acc tct cca cca aca cca tca atg ttt gag gcc aga cat	192
Cys Met Leu Thr Ser Pro Pro Thr Pro Ser Met Phe Glu Ala Arg His	
50 55 60	
gaa gcc gaa tta gtc atc ttc gga gct ctt aac tcg cta ttc aag aaa	240
Glu Ala Glu Leu Val Ile Phe Gly Ala Leu Asn Ser Leu Phe Lys Lys	
65 70 75 80	
acc gga gtc gaa cct aga gat att gga atc ttc att gta aac tgc agc	288
Thr Gly Val Glu Pro Arg Asp Ile Gly Ile Phe Ile Val Asn Cys Ser	
85 90 95	
ttg ttt aac cct aac cca tct ctc tct tcc atg atc gta aac cgg tac	336
Leu Phe Asn Pro Asn Pro Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Asn Arg Tyr	
100 105 110	
aag ctc aaa acc gac gtg aaa aca tac aat ctc tcc cgt atg gga tgc	384
Lys Leu Lys Thr Asp Val Lys Thr Tyr Asn Leu Ser Arg Met Gly Cys	
115 120 125	
agc gcc ggc gca atc tcc gta gat ctc gcc gcg cat ctt g	424
Ser Ala Gly Ala Ile Ser Val Asp Leu Ala Ala His Leu	
130 135 140	

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brassica napus

&lt;400&gt; 23

Gln Pro Thr Asp Ser Cys Lys Ile Ser Ser Glu Thr Phe Phe Asn Met	
1 5 10 15	

Ala Lys Gly Ala Gln Leu Tyr Thr Glu Glu Thr Ile Gln Phe Met Thr	
20 25 30	

Arg Ile Leu Asn Arg Ser Gly Leu Gly Asp Asp Thr Tyr Ala Pro Arg	
35 40 45	

Cys Met Leu Thr Ser Pro Pro Thr Pro Ser Met Phe Glu Ala Arg His	
50 55 60	

Glu Ala Glu Leu Val Ile Phe Gly Ala Leu Asn Ser Leu Phe Lys Lys	
65 70 75 80	

Thr Gly Val Glu Pro Arg Asp Ile Gly Ile Phe Ile Val Asn Cys Ser	
85 90 95	

Leu Phe Asn Pro Asn Pro Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Asn Arg Tyr	
100 105 110	

Lys Leu Lys Thr Asp Val Lys Thr Tyr Asn Leu Ser Arg Met Gly Cys	
115 120 125	

Ser Ala Gly Ala Ile Ser Val Asp Leu Ala Ala His Leu	
130 135 140	

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 394

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brassica napus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (3)...(392)

&lt;223&gt; coding for Brassica homologue H2

&lt;400&gt; 24

cc aac ggc gac gag gtt tcc cgg aac atc gct atc caa cta gcc aaa 47  
 Asn Gly Asp Glu Val Ser Arg Asn Ile Ala Ile Gln Leu Ala Lys  
 1 5 10 15

cac ggt tgt cgg ttg gtg ttg atg gga aac gag gct tct cta agg agc 95  
 His Gly Cys Arg Leu Val Leu Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Arg Ser  
 20 25 30

act gtg gac tac ata cga gtc tct gtt gat gga gcc ttc cca gtg gag 143  
 Thr Val Asp Tyr Ile Arg Val Ser Val Asp Gly Ala Phe Pro Val Glu  
 35 40 45

ctc att gga gcc gac atg gaa gct gat agt gag gaa gat ttc tat gtt 191  
 Leu Ile Gly Ala Asp Met Glu Ala Asp Ser Glu Glu Asp Phe Tyr Val  
 50 55 60

gct gtc caa aag gca tgg act cgt cta gga tct ttg gat gct ttt gtc 239  
 Ala Val Gln Lys Ala Trp Thr Arg Leu Gly Ser Leu Asp Ala Phe Val  
 65 70 75

aac tgc tgt acc tac caa ggg aag atg cag gac att ctc cga gtg tct 287  
 Asn Cys Cys Thr Tyr Gln Gly Lys Met Gln Asp Ile Leu Arg Val Ser  
 80 85 90 95

gaa gat gag ttc aag aaa atc aca agg atc aat ctc acg gct aca tgg 335  
 Glu Asp Glu Phe Lys Lys Ile Thr Arg Ile Asn Leu Thr Ala Thr Trp  
 100 105 110

ttt atc ttg aag gct gtg gca agc atg atg aag gag aat gga aca gga 383  
 Phe Ile Leu Lys Ala Val Ala Ser Met Met Lys Glu Asn Gly Thr Gly  
 115 120 125

ggc tcc att gg 394  
 Gly Ser Ile  
 130

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brassica napus

&lt;400&gt; 25

Asn Gly Asp Glu Val Ser Arg Asn Ile Ala Ile Gln Leu Ala Lys His  
 1 5 10 15

Gly Cys Arg Leu Val Leu Met Gly Asn Glu Ala Ser Leu Arg Ser Thr  
 20 25 30

Val Asp Tyr Ile Arg Val Ser Val Asp Gly Ala Phe Pro Val Glu Leu  
 35 40 45

Ile Gly Ala Asp Met Glu Ala Asp Ser Glu Glu Asp Phe Tyr Val Ala  
 50 55 60

Val Gln Lys Ala Trp Thr Arg Leu Gly Ser Leu Asp Ala Phe Val Asn  
 65 70 75 80

Cys Cys Thr Tyr Gln Gly Lys Met Gln Asp Ile Leu Arg Val Ser Glu  
 85 90 95

Asp Glu Phe Lys Lys Ile Thr Arg Ile Asn Leu Thr Ala Thr Trp Phe  
 100 105 110

Ile Leu Lys Ala Val Ala Ser Met Met Lys Glu Asn Gly Thr Gly Gly  
 115 120 125

Ser Ile  
 130

<210> 26  
<211> 429  
<212> DNA  
<213> Brassica napus

<220>  
<221> CDS  
<222> (2)..(427)  
<223> coding for Brassica homologue H3

<400> 26

g gaa ttt tcg ggt cga cga ttt cgt act act ctg aat cta atg gcc aat 49  
Glu Phe Ser Gly Arg Arg Phe Arg Thr Thr Leu Asn Leu Met Ala Asn  
1 5 10 15

aag gtg ttg atg aca gac aac ggc gac cag gtt tcc cg<sup>g</sup> aac atc gct 97  
Lys Val Leu Met Thr Asp Asn Gly Asp Gln Val Ser Arg Asn Ile Ala  
20 25 30

atc caa cta gcc aaa cac ggt t<sup>t</sup>g cgg ttg gtg atg gga aac gag 145  
Ile Gln Leu Ala Lys His Gly Cys Arg Leu Val Leu Met Gly Asn Glu  
35 40 45

gct tct cta agg agc act gtg gac tac ata cga ttc tct gat gat gga 193  
Ala Ser Leu Arg Ser Thr Val Asp Tyr Ile Arg Phe Ser Asp Asp Gly  
50 55 60

gcc ttc cca gtg gag ctc att gga gcc gac atg gaa gct gat agt gag 241  
Ala Phe Pro Val Glu Leu Ile Gly Ala Asp Met Glu Ala Asp Ser Glu  
65 70 75 80

gaa gat ttc tat gtt gct gtc caa acg gca tgg act cgt cta gga tct 289  
Glu Asp Phe Tyr Val Ala Val Gln Thr Ala Trp Thr Arg Leu Gly Ser  
85 90 95

ttg gat gct ttt gtc aac tgc tgt acc tac caa ggg aag atg cag gac 337  
Leu Asp Ala Phe Val Asn Cys Cys Thr Tyr Gln Gly Lys Met Gln Asp  
100 105 110

att ctc cga gtg tct gaa gat gag ttc aag aaa atc aca cgg atc aat 385  
Ile Leu Arg Val Ser Glu Asp Glu Phe Lys Lys Ile Thr Arg Ile Asn  
115 120 125

ctc acg gct aca tgg ttt atc ttg aag gct gtg gca agc atg at 429  
Leu Thr Ala Thr Trp Phe Ile Leu Lys Ala Val Ala Ser Met  
130 135 140

<210> 27  
<211> 142  
<212> PRT  
<213> Brassica napus

<400> 27

Glu Phe Ser Gly Arg Arg Phe Arg Thr Thr Leu Asn Leu Met Ala Asn  
1 5 10 15

Lys Val Leu Met Thr Asp Asn Gly Asp Gln Val Ser Arg Asn Ile Ala  
20 25 30

Ile Gln Leu Ala Lys His Gly Cys Arg Leu Val Leu Met Gly Asn Glu  
35 40 45

Ala Ser Leu Arg Ser Thr Val Asp Tyr Ile Arg Phe Ser Asp Asp Gly  
50 55 60

Ala Phe Pro Val Glu Leu Ile Gly Ala Asp Met Glu Ala Asp Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Tyr Val Ala Val Gln Thr Ala Trp Thr Arg Leu Gly Ser  
 85 90 95  
 Leu Asp Ala Phe Val Asn Cys Cys Thr Tyr Gln Gly Lys Met Gln Asp  
 100 105 110  
 Ile Leu Arg Val Ser Glu Asp Glu Phe Lys Lys Ile Thr Arg Ile Asn  
 115 120 125  
 Leu Thr Ala Thr Trp Phe Ile Leu Lys Ala Val Ala Ser Met  
 130 135 140

<210> 28  
 <211> 436  
 <212> DNA  
 <213> Brassica napus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (3)...(419)  
 <223> coding for Brassica homologue H4

<400> 28

gt cga cga ttt cgt gga gaa aac aat cta act gga aag atc caa atg	47
Arg Arg Phe Arg Gly Glu Asn Asn Leu Thr Gly Lys Ile Gln Met	
1 5 10 15	

gta tat gca gcc gag ccg gtt tgc acg ctt ttc tta aaa cat ggt cat	95
Val Tyr Ala Ala Glu Pro Val Cys Thr Leu Phe Leu Lys His Gly His	
20 25 30	

gag tcg ggt tca ctc atg tcc cta ttc atg gtg cac cat agc caa gtc	143
Glu Ser Gly Ser Leu Met Ser Leu Phe Met Val His His Ser Gln Val	
35 40 45	

ttt ttc gaa act tgg aca cat ttg aaa gat ctg ata caa gaa gga aaa	191
Phe Phe Thr Trp Thr His Leu Lys Asp Leu Ile Gln Glu Gly Lys	
50 55 60	

gat aca ttc att tct gct cat ggc atg agg atc ttt gaa tac atc ggt	239
Asp Thr Phe Ile Ser Ala His Gly Met Arg Ile Phe Glu Tyr Ile Gly	
65 70 75	

ttg aat gaa caa ttc gct tgt atg ttt aac cat gca atg tca gaa tct	287
Leu Asn Glu Gln Phe Ala Cys Met Phe Asn His Ala Met Ser Glu Ser	
80 85 90 95	

tct acc atg atc atg aag aag att tta gaa gtt tac aga gga ttc gaa	335
Ser Thr Met Ile Met Lys Lys Ile Leu Glu Val Tyr Arg Gly Phe Glu	
100 105 110	

gat att aaa act ttg gtg gat att gga gga gga ctt ggc acc aca cta	383
Asp Ile Lys Thr Leu Val Asp Ile Gly Gly Gly Leu Gly Thr Thr Leu	
115 120 125	

aat ctg gtt act tcc aag tat cct cat ata agg gta taatttcgat	429
Asn Leu Val Thr Ser Lys Tyr Pro His Ile Arg Val	
130 135	

taaactc

436

<210> 29  
 <211> 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brassica napus

&lt;400&gt; 29

Arg	Arg	Phe	Arg	Gly	Glu	Asn	Asn	Leu	Thr	Gly	Lys	Ile	Gln	Met	Val
1				5					10					15	
Tyr	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Cys	Thr	Leu	Phe	Leu	Lys	His	Gly	His	Glu
				20				25					30		
Ser	Gly	Ser	Leu	Met	Ser	Leu	Phe	Met	Val	His	His	Ser	Gln	Val	Phe
				35				40				45			
Phe	Glu	Thr	Trp	Thr	His	Leu	Lys	Asp	Leu	Ile	Gln	Glu	Gly	Lys	Asp
				50				55			60				
Thr	Phe	Ile	Ser	Ala	His	Gly	Met	Arg	Ile	Phe	Glu	Tyr	Ile	Gly	Leu
				65				70			75			80	
Asn	Glu	Gln	Phe	Ala	Cys	Met	Phe	Asn	His	Ala	Met	Ser	Glu	Ser	Ser
				85				90				95			
Thr	Met	Ile	Met	Lys	Lys	Ile	Leu	Glu	Val	Tyr	Arg	Gly	Phe	Glu	Asp
				100				105				110			
Ile	Lys	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Gly	Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Leu	Asn	
				115				120			125				
Leu	Val	Thr	Ser	Lys	Tyr	Pro	His	Ile	Arg	Val					
				130				135							

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brassica napus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(417)

&lt;223&gt; coding for Brassica homologue H5

&lt;400&gt; 30

gct	gaa	ccg	gtt	tgc	acg	ctt	ttt	tta	acc	cgt	ggg	gac	gac	tcg	ggg
Ala	Glu	Pro	Val	Cys	Thr	Leu	Phe	Leu	Thr	Arg	Gly	Asp	Asp	Ser	Gly
1				5				10				15			
act	cac	aag	tcc	ctc	tcc	atg	ttg	ctc	aat	agc	caa	gta	ttt	ttc	aag
Thr	His	Lys	Ser	Leu	Phe	Met	Leu	Leu	Asn	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	Lys
				20				25				30			
aca	tgg	gat	aat	ctg	aag	ggg	gtg	ata	caa	gaa	gga	aaa	gat	gcg	ttt
Thr	Trp	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Val	Ile	Gln	Glu	Gly	Lys	Asp	Ala	Phe
				35				40				45			
agt	tca	gct	cat	ggc	atg	cca	tta	tcc	gaa	tac	atc	ggg	ttg	gat	gag
Ser	Ser	Ala	His	Gly	Met	Pro	Leu	Phe	Glu	Tyr	Ile	Gly	Leu	Asp	Glu
				50				55			60				
caa	ttc	gct	ggt	atg	ttt	aac	cat	gca	atg	gca	gaa	tct	tct	acc	atc
Gln	Phe	Ala	Gly	Met	Phe	Asn	His	Ala	Met	Ala	Glu	Ser	Ser	Thr	Ile
65				70				75			80				
att	atg	aag	aaa	att	tta	gaa	gtt	tac	aga	gga	ttc	gaa	gat	gta	aat
Ile	Met	Lys	Lys	Ile	Leu	Glu	Val	Tyr	Arg	Gly	Phe	Glu	Asp	Val	Asn
				85				90			95				

20

act ttg gtg gat att gga gga gga ctt ggc acc gta cta aac ctt gtc		336	
Thr Leu Val Asp Ile Gly Gly Leu Gly Thr Val Leu Asn Leu Val			
100	105	110	
act tcc aag tat cct caa att aag ggt atc aat ttc gat tta acc atg		384	
Thr Ser Lys Tyr Pro Gln Ile Lys Gly Ile Asn Phe Asp Leu Thr Met			
115	120	125	
gtt tta gcc aat gct cct tct tat cca gga gtg g		418	
Val Leu Ala Asn Ala Pro Ser Tyr Pro Gly Val			
130	135		
<210> 31			
<211> 139			
<212> PRT			
<213> Brassica napus			
<400> 31			
Ala Glu Pro Val Cys Thr Leu Phe Leu Thr Arg Gly Asp Asp Ser Gly			
1	5	10	15
Thr His Lys Ser Leu Phe Met Leu Leu Asn Ser Gln Val Phe Phe Lys			
20	25	30	
Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Val Ile Gln Glu Gly Lys Asp Ala Phe			
35	40	45	
Ser Ser Ala His Gly Met Pro Leu Phe Glu Tyr Ile Gly Leu Asp Glu			
50	55	60	
Gln Phe Ala Gly Met Phe Asn His Ala Met Ala Glu Ser Ser Thr Ile			
65	70	75	80
Ile Met Lys Lys Ile Leu Glu Val Tyr Arg Gly Phe Glu Asp Val Asn			
85	90	95	
Thr Leu Val Asp Ile Gly Gly Leu Gly Thr Val Leu Asn Leu Val			
100	105	110	
Thr Ser Lys Tyr Pro Gln Ile Lys Gly Ile Asn Phe Asp Leu Thr Met			
115	120	125	
Val Leu Ala Asn Ala Pro Ser Tyr Pro Gly Val			
130	135		

<210> 32  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive  
<400> 32  
Gln Pro Thr Asp Ser Cys Lys Ile Ser Ser Glu  
1 5 10  
<210> 33  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive

&lt;400&gt; 33

Glu Thr Phe Phe Asn Met Ala Lys Gly Ala Gln Leu Tyr  
1 5 10

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 34

Glu Thr Ile Gln Phe Met Thr Arg Ile Leu  
1 5 10

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 35

Asn Arg Ser Gly Leu Gly Asp Asp Thr Tyr  
1 5 10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 36

Pro Arg Cys Met Leu Thr Ser Pro Pro Thr Pro Ser Met  
1 5 10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 37

Glu Leu Val Ile Phe Gly Ala Leu Asn Ser Leu Phe Lys Lys Thr Gly  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 38

Gly Ile Phe Ile Val Asn Cys Ser Leu Phe Asn  
1 5 10

<210> 39  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive  
  
<400> 39  
Pro Asn Pro Ser Leu Ser Ser Met Ile Val Asn Arg  
1 5 10  
  
<210> 40  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive  
  
<400> 40  
Tyr Lys Leu Lys Thr Asp Val Lys Thr Tyr Asn Leu Ser  
1 5 10  
  
<210> 41  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive  
  
<400> 41  
Met Gly Cys Ser Ala Gly Ala Ile Ser Val Asp Leu Ala  
1 5 10  
  
<210> 42  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (4)  
<223> E/Q-variation  
  
<400> 42  
Asn Gly Asp Glu Val Ser Arg Asn Ile Ala  
1 5 10  
  
<210> 43  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein motive

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> R/K-variation  
  
<400> 43  
Leu Ala Lys His Gly Cys Arg Leu Val  
1 5  
  
<210> 44  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive  
  
<400> 44  
Met Gly Asn Glu Xaa Ser Leu Arg Ser Xaa Val Asp Xaa Ile Arg  
1 5 10 15  
  
<210> 45  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (14)  
<223> Q/E-variation  
  
<400> 45  
Thr Tyr Gln Gly Lys Xaa Gln Asp Ile Leu Xaa Val Ser Gln Asp Glu  
1 5 10 15  
Phe  
  
<210> 46  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive  
  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> K/R-variation  
  
<400> 46  
Ile Thr Lys Ile Asn Leu Thr Ala Xaa Trp Phe Xaa Leu Lys Ala Val  
1 5 10 15  
Ala  
  
<210> 47  
<211> 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 47

Ala Glu Pro Val Cys Thr Xaa Phe Leu  
1 5

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 48

Glu Gly Lys Asp Xaa Phe Xaa Ser Ala His Gly Met Xaa Xaa Phe Glu  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;400&gt; 49

Glu Gln Phe Ala Xaa Met Phe Asn Xaa Ala Met  
1 5 10

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (8)

&lt;223&gt; V/I-variation

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (13)

&lt;223&gt; K/R-variation

&lt;400&gt; 50

Ala Thr Xaa Ile Met Lys Lys Val Leu Glu Val Tyr Lys Gly Phe Glu  
1 5 10 15

Asp

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

25

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: protein  
motive

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

&lt;222&gt; (5)

&lt;223&gt; V/I-variation

&lt;400&gt; 51

Thr Leu Val Asp Val Gly Gly Gly Xaa Gly Thr  
1 5 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**